

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, Campus Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der Plasma-Ghrelin Spiegel für die Hunger- und Sättigungsregulation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Amelie Steiger

aus
Eggenfelden

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Bärbel Otto
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Jörg Schirra PD Dr. Martin Füchtenbusch
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Florian Lippl
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	03.04.2014

Meinen Eltern

Gliederung

1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	12
2.1. Probandenkollektiv	12
2.2. Die Versuchsserien	13
2.2.1. Versuchsvorbereitungen	13
2.2.2. Dokumentation von Hunger & Sättigung	13
2.2.3. standardisierte Mahlzeiten	14
2.2.4. Herstellung der Infusionslösungen	15
2.2.5. Vorversuche	15
2.2.5.1. Versuchsserie 1	15
2.2.5.2. Versuchsserie 2	16
2.2.5.3. Versuchsserie 3	17
2.2.6. Hauptversuch: Versuchsserie 4	17
2.3. Laboranalysen.....	19
2.3.1. Bestimmung von Acyl-Ghrelin	19
2.3.2. Insulinbestimmung	20
2.3.3. Glukosebestimmung	20
2.3.4. Cortisol und GH-Bestimmung	20
2.4. Statistische Auswertung	21
3. Ergebnisse	22
3.1. VS 1: Physiologische Ghrelinwerte, Hunger- und Sättigungswerte	22
3.2. VS 2&3: Die unterschiedlichen Infusionsmengen und die gemessenen Plasmaghrelinspiegel	23
3.3. VS 4: Vergleich Placebo – vs. Ghrelininfusion	25
3.3.1. Basale Plasmaspiegel	25
3.3.2. Acyl-Ghrelin	25
3.3.3. Hunger und Sättigung, Kalorienaufnahme	26
3.3.4. Glukose und Insulin	29
3.3.5. Cortisol und Wachstumshormon	30

4. Diskussion	32
4.1. Allgemeine Diskussion	32
4.1.1. Ghrelin – Synthese, Struktur, Rezeptor	32
4.1.2. Ghrelin – Auswirkungen auf die zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme.....	33
4.1.3. Ghrelin – Auswirkungen auf die Energiebilanz	35
4.2. Spezielle Diskussion	36
4.2.1. Endogenes Ghrelin – Auswirkungen auf Hunger und Nahrungsaufnahme.....	36
4.2.2. Exogene Ghrelinapplikation	37
4.2.2.1. Zeitpunkt des Infusionsbeginns	37
4.2.2.2. Zeitpunkt und Menge der zweiten Mahlzeit	37
4.2.2.3. Kontinuierliche vs. Bolus-Applikation	38
4.2.2.4. Applizierte Ghrelindosis, erreichte Plasmaspiegel	38
4.2.2.5. Einfluss auf Hunger und Nahrungsaufnahme	39
4.2.2.6. Auswirkungen auf Glukose und Insulin, Cortisol und Wachstumshormon	40
5. Zusammenfassung	42
6. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis	43
7. Abkürzungsverzeichnis	46
8. Quellenangaben	48
9. Danksagung	58
10. Eidesstattliche Versicherung	59

1. Einleitung

Zur Fortbestehung jeder Lebensart sind zunächst zwei elementare Dinge notwendig: zum einen die Herstellung und Aufrechterhaltung der körperlichen Integrität durch Aufnahme der richtigen Menge und Zusammensetzung von Nahrung und zum anderen die Zeugung von Nachkommen durch Fortpflanzung.

In unserer modernen westlichen Welt, in der die Geburtenzahl immer weiter sinkt und die Anzahl an Adipositas leidender Menschen kontinuierlich steigt, scheinen diese Triebe aus dem Gleichgewicht gebracht zu sein.

Vor allem eine sinnvolle Aufnahme von Nahrung, sowohl was die Menge, als auch die Zusammensetzung betrifft, scheint heutzutage bei sehr vielen Menschen gestört zu sein. Durch das unendlich mannigfache Angebot in Supermärkten, Imbissen, Restaurants, aber auch die immer weniger nötige körperliche Aktivität im alltäglichen Leben, haben die Nahrungsaufnahme von einem überlebenswichtigen Gut zu einer Art „Zeitvertreib“ werden lassen. Wen wundert es also, dass Adipositas und deren assoziierte Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, zusammengefasst im „metabolischen Syndrom“, ein immer größer werdendes Problem in unserer Gesellschaft darstellen. So waren laut der Mikrozensusumfrage des statistischen Bundesamtes Deutschland 2009 mehr als die Hälfte der Bevölkerung, nämlich 51.4% übergewichtig, d.h. ihr Body Mass Index (BMI) lag bei $> 25 \text{ kg/m}^2$. Eine Adipositas Grad 1 oder mehr, d.h. ein BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$ bestand bei 14.7% der Befragten. Im Vergleich dazu lag der Anteil Übergewichtiger 1999 noch bei 47.7 %, bzw. der mit Adipositas Grad 1 bei 11.5% [1]. Noch dramatischer ist die Lage in den USA. Hier waren im Jahre 2008, 68.0% der über 20-jährigen übergewichtig und sogar ein Drittel der Bevölkerung (33.8 %) hatten einen BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$ [2]. Interessanterweise sind es in Deutschland mehr Männer, die an Übergewicht leiden, während in den USA mehr Frauen betroffen sind.

Erschreckend sind diese Zahlen vor allem auch, wenn man bedenkt, dass adipöse Patienten eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung haben, unter anderem bedingt durch ihr massiv erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, Diabetes mellitus Typ 2 und Tumorerkrankungen [3, 4]. Aufgrund der hohen Morbidität, die mit dem Übergewicht einhergeht, ist auch der volkswirtschaftliche Schaden, sowohl durch direkte Kosten, z.B. durch Krankenhausbehandlungen, als auch durch indirekte Kosten, z.B. durch langandauernde Arbeitsausfälle, enorm und nicht zuletzt der Grund, warum die Erforschung der Ursachen, Einflüsse und Behandlungen der Adipositas mittlerweile größte Bedeutung gewonnen hat [5].

Aber das Pendel schlägt auch massiv in die andere Richtung aus: Erkrankungen, die mit meist krankhaftem Untergewicht einhergehen, wie Anorexia nervosa oder Bulimia, deren erste Fälle Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben wurden, sind mittlerweile aber massiv auf dem Vormarsch [6]. Auch bei diesen Essstörungen ist eine natürliche Nahrungsaufnahme gestört, es kommt zum mehr oder weniger bewussten Verzicht auf Nahrung, bis hin zu lebensbedrohlichen Mangelzuständen.

Davon abzugrenzen ist der Zustand der Kachexie, der selten durch bewusste Nahrungsmittelrestriktion, sondern v.a. durch chronische Erkrankungen wie COPD, Tumoren, chronische Herzfehler, chronisches Nierenversagen, AIDS und viele mehr, hervorgerufen wird [7]. Hier kommt es durch Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine und durch übermäßige Aktivierung des Sympathikus zu einem katabolen Stoffwechselzustand mit vermehrter Proteolyse und Lipolyse, was zum Abbau von Muskelmasse und Fett führt [8]. Dieser Mangelzustand ist schwer zu therapieren und mit einer niedrigen Lebensqualität und erhöhter Mortalität assoziiert. So geht man davon aus, dass 20-40% der Krebstodesfälle direkt durch die Kachexie bedingt sind [9].

Viele Einflussgrößen, die Hunger, Sättigung und Nahrungsaufnahme regulieren, sind bisher bekannt. Die neuroendokrine Regulation der Nahrungsaufnahme kann man hierbei grob in eine längerfristige Kontrolle der Energiehomöostase, welche sich v.a. in der Körperfettmasse widerspiegelt, und in eine kurzfristige Kontrolle des Hungers, der Initiation und Beendigung der Nahrungsaufnahme unterscheiden [10].

Schon früh erkannte man, dass das Fettgewebe als größter Energiespeicher des Körpers Signale über den aktuellen Sättigungszustand an das ZNS sendet [11]. Das Hormon Leptin, das sich als ein solches Signal herausstellte, wird vom Fettgewebe gebildet und sendet ein Sättigungssignal an das Gehirn. Leptin wird von den Adipozyten direkt proportional zum darin gespeicherten Fett sezerniert [12, 13]. Ein weiteres sog. Adipositassignal ist Insulin. Durch Glukose aus dem Pankreas ausgeschüttet, stimuliert es im peripheren Gewebe anabole Stoffwechselzustände und gibt dem ZNS Feedback über den Ernährungszustand des Körpers. Beide Hormone, Leptin und Insulin, informieren das Gehirn also dosisabhängig über den Körperfettgehalt [14-17]. Dabei sind ihre Rezeptoren v.a. im Nucleus arcuatus des Hypothalamus zu finden, einer Region, deren Einfluss auf die Hunger- und Sättigungsregulation mehrfach beschrieben wurde [18-20].

Kurzfristige Sättigungssignale hingegen werden vom Gastrointestinaltrakt während und nach einer Mahlzeit ausgeschüttet. Über vagale Afferenzen oder über den Blutweg senden sie ihre Signale an den Hirnnervenkern Nucleus tractus solitarii (NTS). Ihre Ausschüttung hängt von

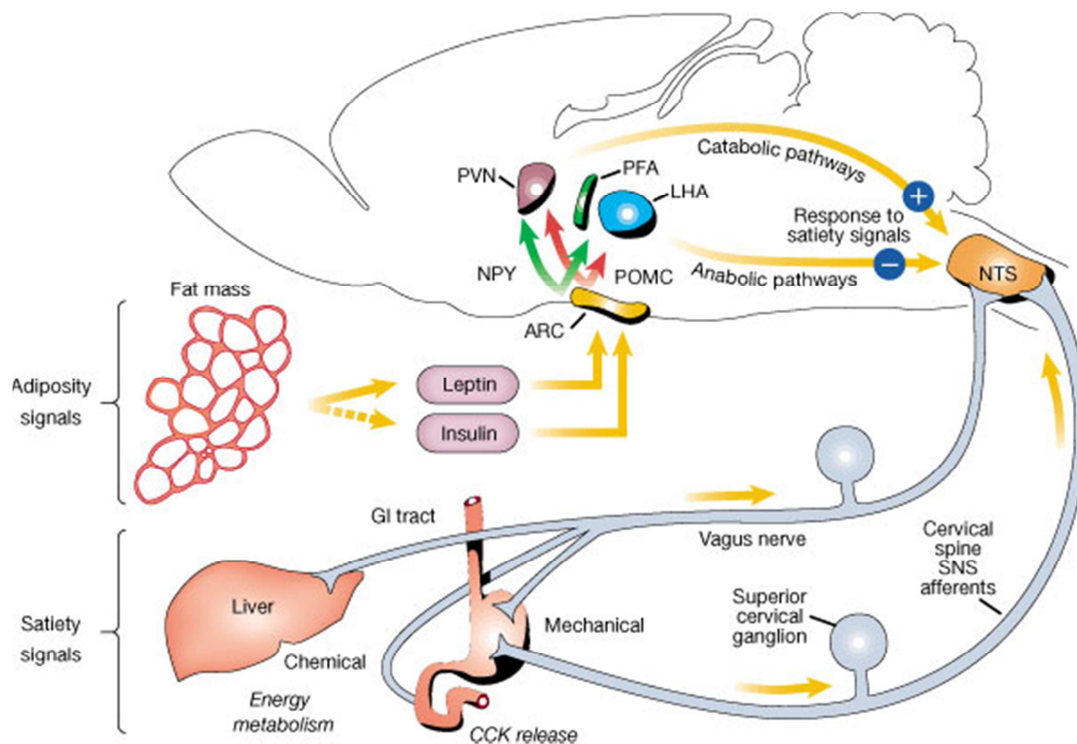


Abb. 1: Dieses Modell veranschaulicht die Signale, die die Nahrungsaufnahme beeinflussen. Die Adipositasignale Leptin und Insulin, die direkt proportional zum Körperfettanteil ausgeschüttet werden, interagieren mit dem ZNS über den ARC und kontrollieren den langfristigen Stoffwechsel und den Fettgehalt des Körpers. Sättigungssignale aus dem GI-Trakt, die direkt nach der Nahrungsaufnahme ausgeschüttet werden, senden dem ZNS Signale über die mechanischen und chemischen Eigenschaften der aufgenommenen Nahrung. Diese werden über sensorische Axone des N.vagus und des Sympathikus zum Nucleus tractus solitarii im Hirnstamm geleitet. Dort werden diese Informationen umgewandelt und induzieren Reaktionen in verschiedenen Regionen des Hypothalamus, der wiederum je nach aufgenommenem Essen eine weitere Nahrungsaufnahme induziert oder reduziert [16, 21].

8

Besonderes Aufsehen erregte hierbei 1999 die Entdeckung des Hormons Ghrelin, welches im Magen gebildet wird und das neben einem Wachstumshormon-stimulierenden Effekt [22, 23] unter anderem Auswirkungen auf die Kontrolle der Nahrungsaufnahme, den Energiehaushalt und die Hunger- und Sättigungsregulation zu haben scheint [24]. Herausragend ist, dass es das erste gastrointestinale Peptidhormon ist, dem orexigene Effekte nachgewiesen werden konnten, was es zum potentiellen Kandidaten in der Behandlung u.a. von kachektischen Patienten macht.

Die Einnahme einer kohlenhydratreichen Mahlzeit führt akut zu einem Abfall der Plasma-Ghrelinspiegel bis zu einem Nadir 60 – 90 min postprandial [24-28]. Daraufhin steigen die Ghrelinwerte wieder auf das präprandiale Niveau an, sodass man vermutet, dass dieser Wiederanstieg die Nahrungsaufnahme induziert [26]. Diese Erkenntnisse lassen sich sowohl für desacetyliertes, als auch für acetyliertes Ghrelin, von dem man ausgeht, dass es die biologisch aktive Form ist, nachweisen [29-33].

Diverse Untersuchungen haben bisher gezeigt, dass exogene Ghrelin-Applikation die Nahrungsaufnahme und das Hungergefühl anregt [34-41]. In diesen früheren Studien wurde Ghrelin entweder als intravenöser Bolus oder als kontinuierliche Infusion injiziert. Jedoch verwendeten alle diese Arbeiten so hohe Ghrelindosen, dass dies immer zu deutlich übernatürlichen Plasmakonzentrationen führte.

Diverse Studien führten eine intravenöse Bolus-Applikation von Ghrelin durch [34-37, 42], wobei verschiedene Dosen von 40 µg [42] bis 3 µg/kgKG [34, 35, 37] verwendet wurden, was zu Plasma-Ghrelinspiegeln im Bereich von bis zu 5000 pg/ml führte [43, 44].

In Arbeiten mit kontinuierlicher Ghrelin-Infusion variierten die verwendeten Dosen zwischen 3.37 ng/kg/min und 50.7 ng/kg/min bei Infusionsperioden von 75 bis 360 min [38-40, 45-47]. Bei der niedrigsten verwendeten Dosis befanden sich die Werte für totales Ghrelin zwischen 2500 und 5000 pg/ml, wobei die basalen Level vor Beginn der Infusion bei 700 bis 1500 pg/ml lagen [38, 40, 46, 48, 49].

Die Plasma Werte des acetylierten Ghrelins wurden während Ghrelin-Infusion in verschiedenen Studien gemessen [34, 43, 50-52]. Dabei stiegen die basalen Werte von 37 bis 82 pg/ml bis zu maximalen 900 bis 2300 pg/ml an [34, 43, 50, 51]. Hier ist hervorzuheben, dass es sich bei den basalen Werten bereits um sehr hohe präprandiale Werte handelt, die durch die i.v. Ghrelin-Gabe noch stärker erhöht wurden.

Sowohl in Studien mit Bolusapplikation von Ghrelin [34-37], als auch in einigen mit kontinuierlicher i.v.-Gabe [38-40, 45, 47], konnte ein Anstieg des Hungergefühls beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten andere Veröffentlichungen jedoch, dass Ghrelin keinen Effekt auf die Hungerentwicklung hat [46, 48, 53].

Zudem konnte eine alleinige Steigerung der Nahrungsaufnahme durch Ghrelinapplikation, ohne Einfluss Hunger und Sättigung, in einigen Studien nachgewiesen werden [37, 40, 41, 45].

Was die endogenen Ghrelinspiegel betrifft, konnte mehrfach eine positive Korrelation zwischen ansteigendem Plasmaghrelin und Initiation der Nahrungsaufnahme demonstriert werden [26, 54, 55]. Der postprandiale Abfall des Ghrelins zeigt sich jedoch nicht für alle Nahrungsmittel, die verwendet wurden. So konnte nur nach Einnahme kohlenhydratreicher Mahlzeiten, insbesondere durch Pasta und Reis, eine Suppression der endogenen Ghrelinausschüttung verzeichnet werden [55, 56].

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass bisherige Studien, egal, ob sie sich mit exogenem oder körpereigenem Ghrelin befassen, nicht zu eindeutigen Ergebnissen kommen, welche Rolle Ghrelin in der Regulation und Initiation der Nahrungsaufnahme besitzt.

Die Möglichkeit, die physiologische Rolle der Mehrheit gastrointestinaler Hormone untersuchen zu können, wurde verbessert, seit man mit adäquaten Infusionsraten den postprandialen Anstieg dieser körpereigenen Hormone nachahmen kann. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um deren physiologischen Funktionen genauer einschätzen zu können [57]. Im Falle von Ghrelin muss man diese experimentelle Herangehensweise an die Tatsache angleichen, dass das Peptidhormon postprandial zunächst abfällt. Außerdem zeigte die Erfahrung mit Visuellen Analogskalen (VAS), dass Probanden nach einer nächtlichen Fastenperiode am Morgen sehr hungrig sind, sodass dieser Hunger schwer noch gesteigert werden kann. Deswegen beschlossen wir, die Ghrelin-Infusion postprandial am Nadir der Plasmaghrelinwerte, wenn die Hungergefühle minimal sind, zu starten. Wir imitieren auf diese Art und Weise den postprandialen, physiologischen Ghrelinanstieg und wollen somit die spezielle Rolle dieses Wiederanstieges bei der Hungerentwicklung und Nahrungsaufnahme untersuchen. Damit unterscheiden wir uns von allen anderen bisherigen Studien, die mit ihren Ghrelininfusionen durchwegs im Fastenzustand begannen [38-40, 45-48, 53]. Die einzige bekannte Studie mit einer ähnlichen Vorgehensweise ist die von Neary et al. [41], die Krebspatienten sehr hohe Ghrelindosen applizierten. Auch sie begannen die i.v. Ghrelingabe

am Nadir der Plasmaghrelinwerte, jedoch reichten sie eine zweite festgelegte Mahlzeit 90 min nach Beginn der Infusion und nicht dann, wenn die Probanden dies verlangten, wie in unserer Arbeit.

Ziel der möglichst genauen Erforschung des Hormons Ghrelin ist natürlich schlussendlich die Hoffnung auf therapeutische Konsequenzen. Es besteht die Aussicht auf eine Beeinflussung der Nahrungsaufnahme sowohl bei adipösen Patienten, als auch bei Patienten, die physiologisch oder auch im Laufe von Erkrankungen, im Sinne von Essstörungen, konsumierenden Erkrankungen, wie Tumoren, oder anderen Kachexie induzierenden Zuständen, einen erhöhten Energiebedarf haben.

2. Material und Methoden

In unserer Arbeit führten wir verschiedene Vorversuche durch, um

- 1) in Versuchsserie 1: die physiologischen Plasmaspiegel der endogenen postprandialen Ghrelinausschüttung und die Entwicklung der Hungerwerte zu untersuchen,
- 2) in Versuchsserie 2: die passende Infusionsdosis zur Imitation der physiologischen Ghrelinspiegel zu finden, indem wir ansteigende Ghrelindosen infundierten und die zugehörige Plasmakonzentration maßen und
- 3) in Versuchsserie 3: die gefundene Infusionsdosis zu verifizieren.

Im Hauptversuch, Versuchsserie 4, untersuchten wir im Placebovergleich, ob durch eine kontinuierliche, niedrig dosierte Ghrelininfusion, die zum Nadir der physiologischen Ghrelinwerte startet

- 1) die Hunger-bzw. Sättigungsentwicklung verändert wird,
- 2) der Zeitpunkt und die Menge der selbst gewählten Nahrungsaufnahme verändert wird und
- 3) ob sich eine Veränderung in den postprandialen Glukose- bzw. Insulinwerten und den Wachstumshormon- und Cortisolwerten ergibt.

2.1 Das Probandenkollektiv

Die Untersuchung fand an insgesamt 23 verschiedenen gesunden männlichen Probanden statt. Diese waren durchschnittlich 27 ± 0.3 Jahre alt, gesund, normalgewichtig (BMI 24 ± 0.4 kg/m²) und hatten eine negative Suchtanamnese. Alle Probanden nahmen freiwillig teil und gaben vor Beginn der Studie schriftlich ihre Einverständniserklärung.

Bei keinem der Probanden war eine akute oder chronische Erkrankung anamnestizierbar, bei der körperlichen Untersuchung konnte dies weiter ausgeschlossen werden. Die Vitalparameter, die vor jeder Untersuchung erhoben wurden, waren jederzeit normwertig (RR $126/77 \pm 1,5/1,0$ mmHg, Puls $71 \pm 1,0$ Schläge/min).

	Probandenkollektiv
Alter (Jahre)	27 ± 0.3
BMI (kg/m ²)	24 ± 0.4
RR systolisch (mmHg)	126 ± 1.5
RR diastolisch (mmHg)	77 ± 1.0
Puls (Schläge/min)	71 ± 1.0

Tabelle1: Probandenkollektiv der gesamten Studie (n=23) mit durchschnittlichem Alter, BMI, RR und Puls

Je nach Versuchsreihe wurden die Probanden an einem bzw. zwei Tagen in VS 4, jeweils mit mindestens 7 Tagen Abstand, untersucht. In dieser Zeit wurden sie gebeten, auf Alkohol zu verzichten und sich ausgewogen zu ernähren.

Die Studie wurde von den lokalen Ethikkomitees der Ludwig Maximilian Universität München und der Technischen Universität München genehmigt. Ihre Durchführung entspricht den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki.

2.2 Die Versuchsserien

2.2.1 Versuchsvorbereitungen

Die Versuche fanden in einem ruhigen, temperaturneutralen Raum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München, Campus Innenstadt statt. Dieser war getrennt von Labor und Küche, wo die Essenszubereitung stattfand, um etwaige Beeinflussungen zu vermeiden.

Die Probanden fanden sich jeweils um 8:00 Uhr morgens, nüchtern, nach einer 12-stündigen Fastenperiode, in der Klinik ein. Nach einer 10-minütigen Ruhepause wurden das aktuelle Gewicht, die Größe, Blutdruck und Puls dokumentiert und eine Venenverweilkanüle bei den Vorversuchen bzw. zwei beim Hauptversuch, zur Infusion bzw. zur regelmäßigen Entnahme von Blutproben, am Unterarm installiert. Die Kanüle zur Blutentnahme wurde kontinuierlich mit geringen Mengen an 0,9%NaCl-Lösung gespült, um ein Gerinnen des Blutes darin zu vermeiden. Bei den Blutentnahmen wurden die ersten 3ml jeweils verworfen. Nach Beendigung des jeweiligen Versuchstages wurden die Kanülen wieder entfernt.

2.2.2 Dokumentation von Hunger und Sättigung

Zur Erfassung des subjektiven Hunger-bzw. Sättigungsgefühls der Probanden wurde eine

visuelle Analogskala (VAS) benutzt - eine Methode, die valide und etabliert ist [58]. Hier sollten die Teilnehmer zu jedem Testzeitpunkt ihr aktuelles Empfinden auf einer nicht unterteilten Skala von 100 mm Länge zwischen keinem bzw. maximalem Hunger (bzw. Sättigung) mit einem vertikalen Strich einzeichnen. Daraufhin gaben die Probanden das Blatt wieder ab, sodass keine Beeinflussung durch vorherige Werte stattfinden konnte. Später wurde von uns die Strecke nachgemessen und ausgewertet [55].

Proband: Datum: Zeitpunkt: Uhrzeit:	Versuchsreihe:	
kein Hunger	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div> </div>	maximaler Hunger

Proband: Datum: Zeitpunkt: Uhrzeit:	Versuchsreihe:	
kein Sättigungs- gefühl	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div> </div>	maximales Sättigungs- gefühl

Abb. 2: Visuelle Analogskalen zur Beurteilung des Hunger- bzw. Sättigungsgefühls. Die Probanden waren angehalten, durch einen vertikalen Strich ihr aktuelles Befinden anzugeben.

2.2.3 Die standardisierten Mahlzeiten

Das Frühstück, das die Probanden erhielten, wurde wie alle Mahlzeiten in einer separaten Küche vorbereitet und bestand aus 132g Sternsemmel aus hellem Weizenmehl, 50g Butter und 125g Marmelade (verschiedene Sorten). Insgesamt ergab dies 1050.8 kcal, bestehend aus 55.5% Kohlenhydrate, 41.1% Fett und 6.3% Eiweiß. Die Teilnehmer wurden gebeten, die Mahlzeit innerhalb von 15 Minuten einzunehmen.

Vor Beginn der Studie wurde sichergestellt, dass die Mahlzeiten dem Geschmack aller

Probanden entsprechen.

Zudem stand ihnen jederzeit unbegrenzt stilles Wasser zur Verfügung.

Das Mittagessen bestand aus geviertelten Toastscheiben, belegt mit Butter und Schinken bzw. Käse. Hiervon sollten die Probanden zu einem selbst gewählten Zeitpunkt, an dem ihr Hunger wieder so stark war, dass sie gerne Mittagessen wollten, so viele essen, bis sie satt waren. Das Essen wurde auf einer Kühlplatte serviert, um eine gleichmäßige Qualität zu garantieren. Damit immer eine genügend große Menge an Sandwiches zur Verfügung stand, wurden diese regelmäßig nachgefüllt. Hierdurch sollte eine Beeinflussung der Versuchspersonen durch das Wissen um ihre bereits verzehrte Nahrungsmenge vermieden werden. Ein Schinkensandwich hatte jeweils 30.1 kcal, bestehend aus 39.1% Kohlenhydraten, 40.0% Fett, 19.9% Eiweiß, ein Käsesandwich 42.4 kcal, bestehend aus 27.3% Kohlenhydraten, 56.3% Fett und 15.4% Eiweiß. Die verzehrte Menge, sowie der Zeitpunkt wurden von uns registriert.

2.2.4 Herstellung der Infusionslösungen

Es wurde Ghrelin (Clinalfa, Läfelfingen, Schweiz) in Zubereitungen á 88 µg verwendet. Zur Herstellung der Infusionslösung für den Verum-Versuch wurde dies in 1 ml Aqua destillata der Fa. Braun aufgelöst, in 4 Portionen á 0.25 ml geteilt und tiefgefroren. An jedem Versuchstag wurde eine Portion aufgetaut und 0.2 ml davon in 100 ml NaCl verteilt, sodass eine Ghrelin-Konzentration von 176 ng/ml entstand. Der Rest wurde verworfen. Die Verum- bzw. Placebo-Infusion wurde kontinuierlich, über das Perfusor-System Becton-Dickinson Pilot C, in der jeweils aus Körpergewicht und Infusionsmenge berechneten Geschwindigkeit verabreicht.

2.2.5 Vorversuche

2.2.5.1 Versuchsserie 1:

Hier wurde die physiologische Entwicklung der Ghrelinspiegel, sowie der Hunger- und Sättigungsratings ohne Infusion von Ghrelin an insgesamt 8 verschiedenen Probanden untersucht.

Zuerst fand die oben beschriebene Vorbereitung der Teilnehmer statt. Der Versuch begann bei -20 min mit der ersten Blutentnahme und dem Ausfüllen der VAS. Nach dieser Ruhephase

wurde das standardisierte Frühstück zum Zeitpunkt 0 min gereicht. In den darauffolgenden 120 min wurde viertelstündlich Blut entnommen, ab 120 min bis 300 min halbstündlich. Die Probanden waren jeweils angehalten, ihr aktuelles Hunger-bzw. Sättigungsgefühl auf einer VAS festzuhalten.

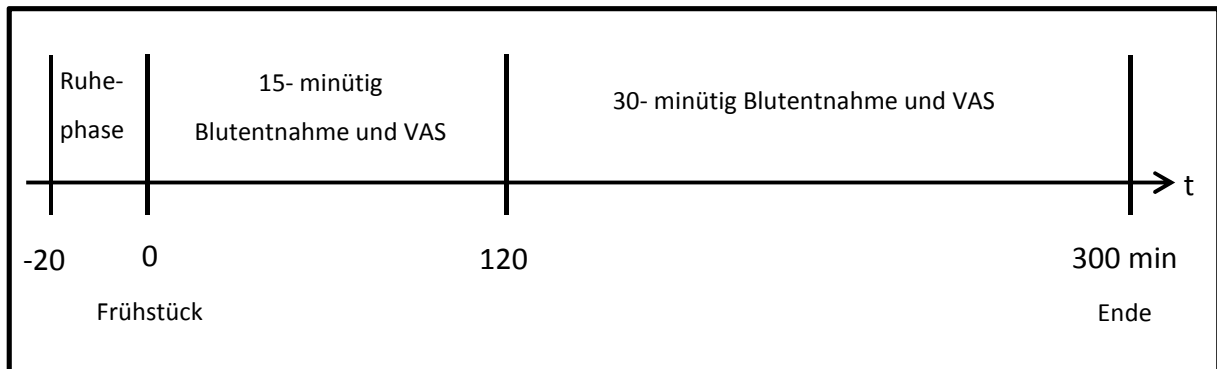


Abb 3: Versuchsaufbau der VS 1: nach einer 20-minütigen Ruhephase wurde das Frühstück bei 0 min gereicht. Die nächsten 120 min wird viertelstündlich Blut entnommen und die VAS von den Probanden ausgefüllt. Von 120 bis 300 min erfolgt dies 30-minütig.

2.2.5.2 Versuchsserie 2:

Diese Versuchsserie galt der Findung derjenigen Ghrelinosis, die in der Hauptuntersuchung eingesetzt werden sollte. Unser Ziel war die Dosis zu finden, die den natürlichen Anstieg der Ghrelinspiegel bestmöglich imitiert. Wir infundierten dazu verschiedene Mengen an Ghrelin, um die zugehörigen Plasmaspiegel zu untersuchen.

Hierzu wurde nach der üblichen Vorbereitung 4 Probanden in einer Ruhephase von -40 min bis 0 min zunächst 0.9% NaCl-Lösung infundiert, von Zeitpunkt 0 min an wurde jeweils für eine halbe Stunde Ghrelin - Konzentrationen von 0.5 ng/kg KG/min, dann 1.0 ng/kg KG/min und zuletzt 2.0 ng/kg KG/min in aufsteigender Reihenfolge kontinuierlich infundiert. Während der gesamten Zeit wurde 10-minütlich Blut entnommen und Hunger bzw. Sättigung auf den VAS dokumentiert.

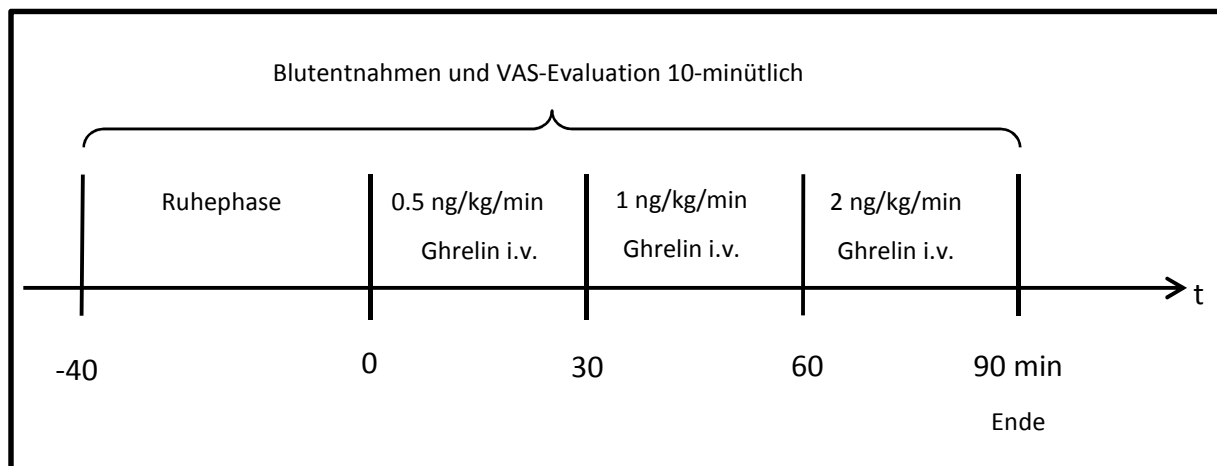


Abb. 4: Versuchsaufbau der VS 2: nach einer 40-minütigen Ruhephase wurde bei 0min mit der Ghrelininfusion begonnen. In den folgenden 30 min wurde Ghrelin in einer Konzentration von 0.5 ng/kgKG/min infundiert, von 30 bis 60 min mit 1 ng/kgKG/min und schließlich von 60 bis 90 min mit 2 ng/kgKG/min. Während dieser Zeit erfolgten die Blutentnahmen und das Ausfüllen der VAS 10-minütig.

2.2.5.3 Versuchsserie 3:

In Versuchsserie 2 zeigte sich, dass die kontinuierliche Infusion von 1.0 ng/kg KG/min Ghrelin dem physiologischen postprandialen Anstieg am besten entspricht. Um dies zu verifizieren und um weitere Informationen bezüglich Geschwindigkeit und maximaler Höhe des Anstiegs des Plasma-Ghrelin Spiegel bei dieser Konzentration zu erhalten, wurde eine weitere Versuchsserie mit 4 Probanden durchgeführt, die nach 40-minütiger Ruhepause für 90 Minuten kontinuierlich Ghrelin in einer Dosierung von 1.0 ng/kgKG/min erhielten. Auch hier wurden 10-minütlich Blutproben gewonnen und das Hunger – und Sättigungsgefühl evaluiert.

2.2.6 Hauptversuch: Versuchsserie 4

Nach der Bestimmung der physiologischen Ghrelinspiegel und der Dosisfindung schloss sich nun der eigentliche Hauptversuch an.

Hierbei war nun unser Ziel, in einer randomisierten, doppel-blinden, cross-over Studie zu untersuchen, ob niedrig dosierte Ghrelin-Infusion im Placebovergleich Zeitpunkt und Menge der Nahrungsaufnahme und das Hunger-bzw. Sättigungsgefühl beeinflusst. Außerdem beobachteten wir die Auswirkungen auf Glukose- und Insulinspiegel, bzw. auf Cortisol- und Wachstumshormonwerte.

An dieser Versuchsreihe nahmen 20 verschiedene Probanden teil, die an jeweils zwei

verschiedenen Tagen entweder eine kontinuierliche Infusion von 1 ng/kgKG/min Ghrelin oder das Placebo (0.9% NaCl-Lösung) erhielten. Der Versuchsablauf dieser Doppelblindstudie war an beiden Tagen vollständig identisch, sodass sowohl für Teilnehmer als auch für die durchführenden Personen Verum und Placebo nicht zu unterscheiden war.

Nach der üblichen Vorbereitung wurde in der Ruhephase von -40 min bis 0 min jeweils 10-minütlich Blut entnommen und die VAS ausgefüllt. Zum Zeitpunkt 0 min wurde wiederum das standardisierte Frühstück gereicht. In den folgenden 60 min fanden Blutentnahmen und Ratings 15-minütlich statt.

Da sich in den vorangehenden Versuchen zeigte, dass ca. 60 min nach Nahrungsaufnahme der Nadir der Plasma-Ghrelin Spiegel erreicht wird, wurde mit der Ghrelin- bzw. Placeboinfusion zu diesem Zeitpunkt (60 min) begonnen und kontinuierlich bis zum Ende fortgeführt. Bis zur 180. Minute wurde 10-minütlich, später alle 15 Minuten die Blutabnahme getätigt und die Hunger- und Sättigungsratings erhoben.

Eine zweite Mahlzeit, wie oben beschrieben, konnte von den Probanden zu demjenigen Zeitpunkt verlangt werden, zu dem ihr Hunger es verlangte. Hiervon konnten sie essen so viel sie wollten, bis sie ein angenehmes Sättigungsgefühl verspürten. Die Sandwiches sollten in der Dauer einer normalen Mahlzeit zu sich genommen werden. Anschließend wurde die Infusion für eine weitere Stunde postprandial durchgeführt.

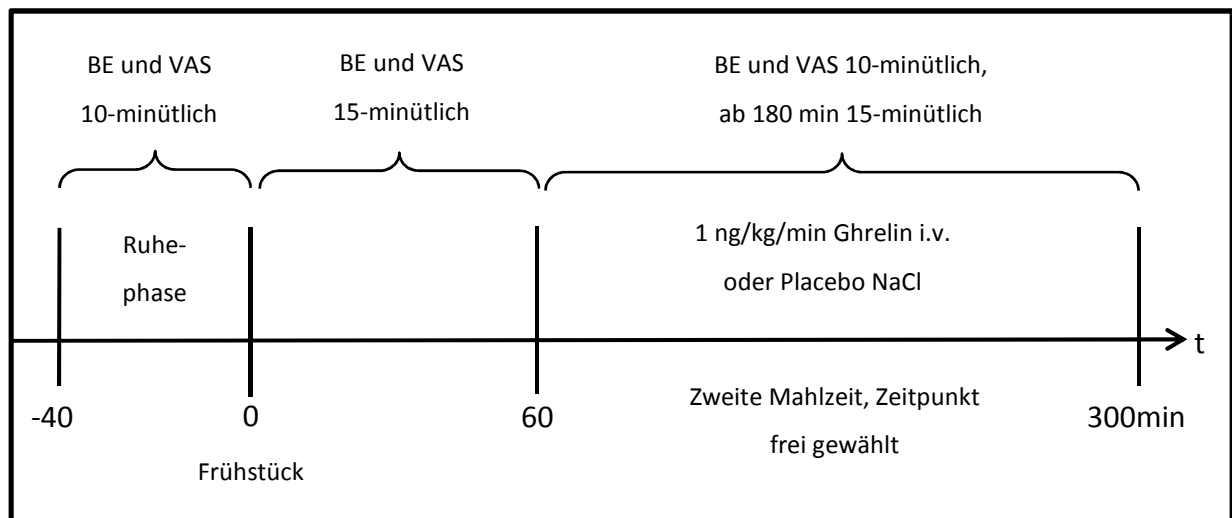


Abb. 5: Versuchsaufbau der VS 4: nach einer 40-minütigen Ruhephase wurde das Frühstück bei 0 min gereicht. In den folgenden 60 min fanden die Blutentnahmen bzw. VAS-Evaluationen 10-minütlich statt. Von 60 bis 300 min wurde 1 ng/kgKG/min Ghrelin bzw. NaCl infundiert. In diesem Zeitraum konnten die Probanden, wenn sie wieder Hunger verspürten, eine zweite Mahlzeit zu sich nehmen, dessen Menge und Zeitpunkt selbst bestimmt wurde.

2.3 Laboranalysen

Blut zur Bestimmung der Peptidhormone (Acyl-Ghrelin, Insulin, Cortisol und Wachstumshormon) wurde in Röhrchen mit EDTA-Puffer gesammelt, das zur Glukosebestimmung in Röhrchen mit NaF-Puffer. Alle Proben wurden mit demselben Assay doppelt bestimmt.

2.3.1 Bestimmung von Acyl-Ghrelin

Da biologisch aktives Ghrelin extrakorporal rasch abgebaut wird, wurden die Proben nach der Entnahme sofort auf Eis gelagert und so schnell wie möglich, spätestens innerhalb von 20min, weiterverarbeitet. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 2000 rpm wurde das Plasma zusammen mit 50 µl 1N HCl und 10 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Deutschland) pro ml Plasma angesäuert, um Proteindegradation zu vermeiden. Anschließend wurden die Aliquote bei -20°C tiefgefroren. Die PMSF-Lösung wurde jeden Tag in einer Konzentration von 10 mg/ml in 100 %igem Alkohol frisch zubereitet.

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von aktivem Ghrelin wurde ein handelsüblicher Radioimmunoassay (LINCO Reserch, St. Charles, Missouri, USA) verwendet [59].

Das Prinzip des Radioimmunoassays, erstmalig 1960 von Yalow und Berson veröffentlicht [60], besteht darin, dass eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem Antigen, dem Tracer, mit einer ebenfalls bekannten, geringeren Menge Antikörper so in Lösung gebracht wird, dass nur ein gewisser Anteil des Tracers, z.B. 50 %, an Antikörper binden kann. Fügt man nun unmarkiertes Antigen unbekannter Menge zu, konkurriert es mit dem Tracer um die begrenzten Antikörperbindungen, wobei sich hierbei nach einer Inkubationszeit ein Gleichgewicht einstellt. Mit steigendem Anteil an unmarkiertem Antigen sinkt also die Menge an Antikörper-gebundenem Tracer. Nun wird der freie Tracer vom gebundenen mittels Immunpräzipitation und anschließender Zentrifugation getrennt und die Radioaktivität der Probe mit einer Gamma-Kamera gemessen. Anhand einer Standardkurve wird daraus die Konzentration des unbekannten Antigens bestimmt. Im Fall des RIA Kits für Acyl-Ghrelin richtet sich der Antikörper gegen die Oktanoyl-Gruppe an Serin (3.Position), die die biologisch aktive Form von Ghrelin von der desacetylierten Form unterscheidet.

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die Proben mit Ghrelin-Antikörper vom Meerschweinchen über Nacht für 24h inkubiert, um sie am nächsten Tag mit dem ¹²⁵I-Ghrelin-Tracer zu mischen. Nach einer weiteren Nacht wurde dem Gemisch anti-

Meerschweinchen-IgG-Serum von der Ziege zugegeben, um eine Ausfällung der Antikörper zu erreichen und es 20 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die automatisierte Messung des verbliebenen Tracers mit der Gamma-Kamera.

Die Sensitivität des Kits lag bei 7.8 pg/ml ($\text{pg/ml}/3.370 = \text{pmol/l}$), der Variationskoeffizient zwischen den Assays lag bei 9.6 %, innerhalb der Assays bei 6.7%.

2.3.2 Insulinbestimmung

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration wurde der RIA Kit Coat-A-Count Insulin Kit (SIEMENS Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA) verwendet. Das Testprinzip besteht darin, dass eine bestimmte Menge ^{125}I -markiertes Insulin mit dem Patienteninsulin um dieselbe Antikörperbindungsstelle konkurriert. Nach einer festgesetzten Inkubationszeit (über Nacht 18-24 h) wird der Überstand abgesaugt und die Antigen-Antikörper-Verbindungen werden mit einer Gamma-Kamera gemessen. Die Counts sind folglich zu der Konzentration umgekehrt proportional. Wir führten eine Doppelbestimmung aller Proben durch. ($\mu\text{U/ml} \times 7.5 = \text{pmol/l}$)

2.3.3 Glukosebestimmung

Die Glukosekonzentrationen wurden mittels enzymatischem UV-Test mit Hexokinase (Greiner Diagnostic GmbH, Bahlingen, Deutschland) quantitativ photometrisch bestimmt. Jede Probe wurde doppelt gemessen und entsprechend den Angaben des Herstellers 10 μl Probe mit 1000 μl Reagenz gemischt, 5 min bei 37°C inkubiert und daraufhin die Extinktion gemessen. Die untere Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei 2 mg/dl (0.1 mmol/l), die obere Nachweisgrenze bei 900 mg/dl bei 365nm Wellenlänge. In diesem Bereich misst der Test linear, der Umrechnungsfaktor beträgt $\text{Glukose} [\text{mg/dl}] \times 0.055 = \text{Glukose} [\text{mmol/l}]$.

2.3.4 Cortisol und GH-Bestimmung

Wir benutzten einen automatisierten Chemiluminescence Immunoassay (Liaison, Diasorin, Sallugia, Italien) zur Bestimmung der Cortisol- und Wachstumshormonkonzentrationen im Serum.

Der Nachweis von GH erfolgte mit einem Sandwichassay, der zwei monoklonale Antikörper benutzt. Die untere Nachweisgrenze beträgt hierbei 0.1 ng/ml, sodass bei Ergebnissen hierunter willkürlich der Wert 0.1 ng/ml für weitere Berechnungen gewählt wurde. Die Variabilität zwischen den Assays betrug 4.4 % bei Konzentrationen von 0.4 ng/ml bzw. 2.4 % bei 1.2 ng/ml. Innerhalb der Assays betrug die Variabilität 6.0 % bzw. 7.2 % bei denselben

Konzentrationen.

Die Cortisolkonzentrationen wurden mithilfe eines kompetitiven Assays, der nur einen spezifischen Antikörper benutzt, bestimmt. Die Kreuzreaktivität mit strukturell ähnlichen Steroidhormonen war hierbei vernachlässigbar klein. Die untere Nachweisgrenze betrug 0.5 µg/dl. Bei 2 µg/dl ergibt sich eine Variabilität innerhalb der Assays von 9.2 %, zwischen den Assays von 4.0 %.

2.4 Statistische Auswertung

Alle gewonnenen Daten wurden im Programm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) gespeichert und als Mittelwerte plus/minus der Standardabweichung vom Mittelwert (standard error of the mean, \pm SEM) angegeben.

Die Steigung des 60-minütigen Intervalls nach der zweiten Mahlzeit (240 - 300 min) wurde als area under the curve (AUC) gemäß der Trapez-Regel errechnet. Hierbei wird das Integral einer Funktion in einem begrenzten Bereich numerisch ermittelt, indem die AUC durch ein Trapez bzw. viele kleine ersetzt wird und man sich somit der wirklichen Fläche annähert.

Um Verum und Placebo zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mittels t-Test für gepaarte Werte, unter Berücksichtigung des multiplen Testens gemäß der Bonferroni-Regel, geprüft. Alle ermittelten p-Werte sind zweiseitig und unterliegen einem Signifikanzniveau von 0.05.

Die statistischen Berechnungen wurden alle mittels dem Programm SPSS (Version 17.5) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 VS 1: Physiologische Ghrelinwerte, Hunger- und Sättigungswerte

Die Untersuchung der physiologischen Entwicklung des aktiven Ghrelins an 8 Probanden in Versuchsserie 1 ergab einen präprandialen, basalen Spiegel von 86 ± 13.8 pg/ml. Postprandial, nach dem Frühstück, zeigte sich ein Abfall des Ghrelinspiegels auf einen Nadir von 58 ± 8.4 pg/ml nach 60 min. Erst zum Zeitpunkt 180 min wurden die basalen Ghrelinspiegel wieder erreicht, um danach weiter, bis zu dem von uns gemessenen maximalen Wert bei 300 min von 120 ± 19.3 pg/ml, anzusteigen.

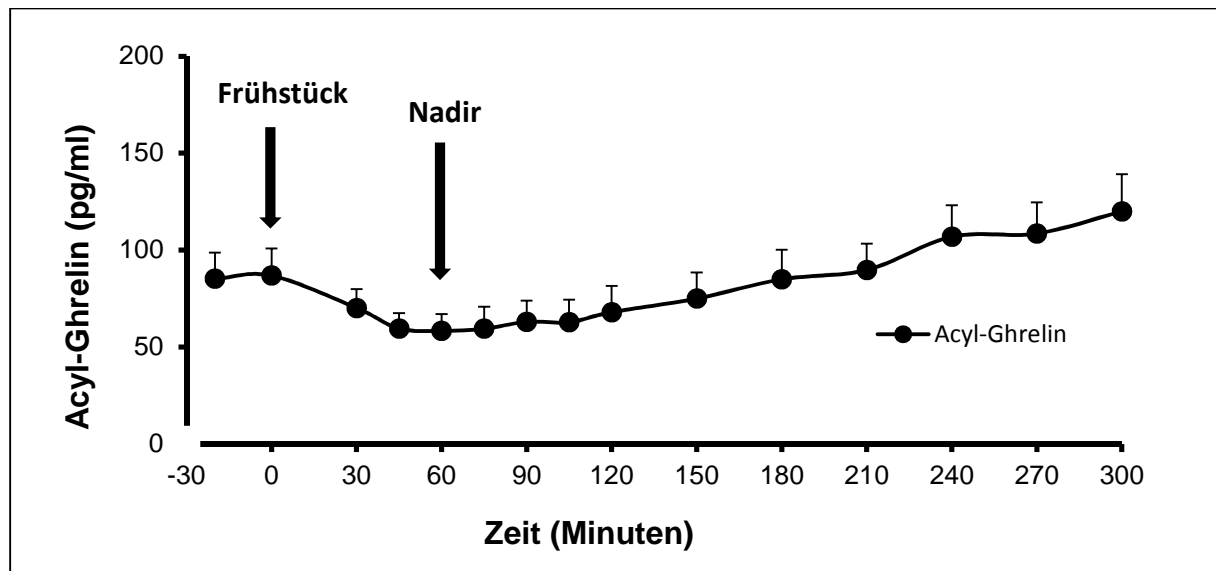


Abb. 6: Verlauf der physiologischen Acyl-Ghrelinswerte in VS 1 (n=8).

Die Hunger- und Sättigungswerte verliefen größtenteils entgegengesetzt.

Präprandial gaben die Probanden ihren Hunger bei 70 ± 10.5 mm auf der VAS an, ihr Sättigungsgefühl lag bei durchschnittlich 22 ± 11.6 mm. Unmittelbar nach Einnahme des Frühstücks sank das Hungergefühl sehr schnell auf minimal 9 ± 4.5 mm zum Zeitpunkt 30min, wohingegen die Sättigung bis zum maximalen Wert von 89 ± 4.4 mm anstieg. Im Verlauf stiegen die Hungerratings kontinuierlich bis maximal 75 ± 8.0 mm bei 300min an, die Sättigungskurve sank bis zu einem Minimum von 18 ± 8.0 mm.

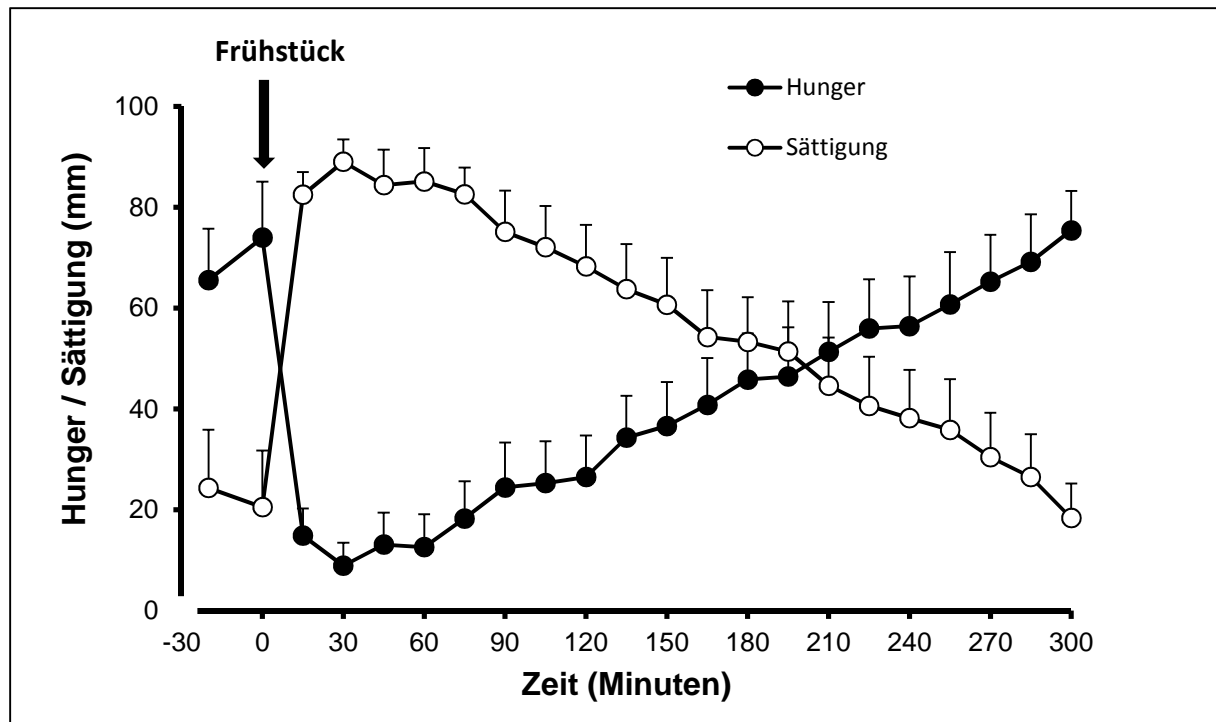


Abb. 7: Verlauf der physiologischen Hunger- und Sättigungswerte in VS 1 (n=8).

3.2 VS 2 & 3: Die unterschiedlichen Ghrelininfusionsmengen und die gemessenen Plasmaghrelin Spiegel

In Versuchsserie 2, in der verschiedene Konzentrationen der Ghrelininfusion jeweils für 30min getestet wurden, maßen wir bei 4 Probanden einen basalen Ghrelinspiegel von 123 ± 34.2 pg/ml. Durch die Infusion von 0.5 ng/kg KG/min Ghrelin stieg dieser auf durchschnittlich 147 ± 50.8 pg/ml an. Steigerte man die Infusionskonzentration auf 1.0 ng/kg KG/min zeigten sich Werte von 170 ± 49.7 pg/ml, bei 2.0ng/kg KG/min lagen sie bei 248 ± 54.6 pg/ml.

Es zeigt sich also, dass durch eine Infusion mit der Konzentration von 1 ng/kg KG/min der Anstieg der Plasma-Ghrelinwerte am ehesten dem physiologischen Anstieg, wie wir ihn in VS 1 zwischen 60 und 180 min gesehen haben, entspricht.

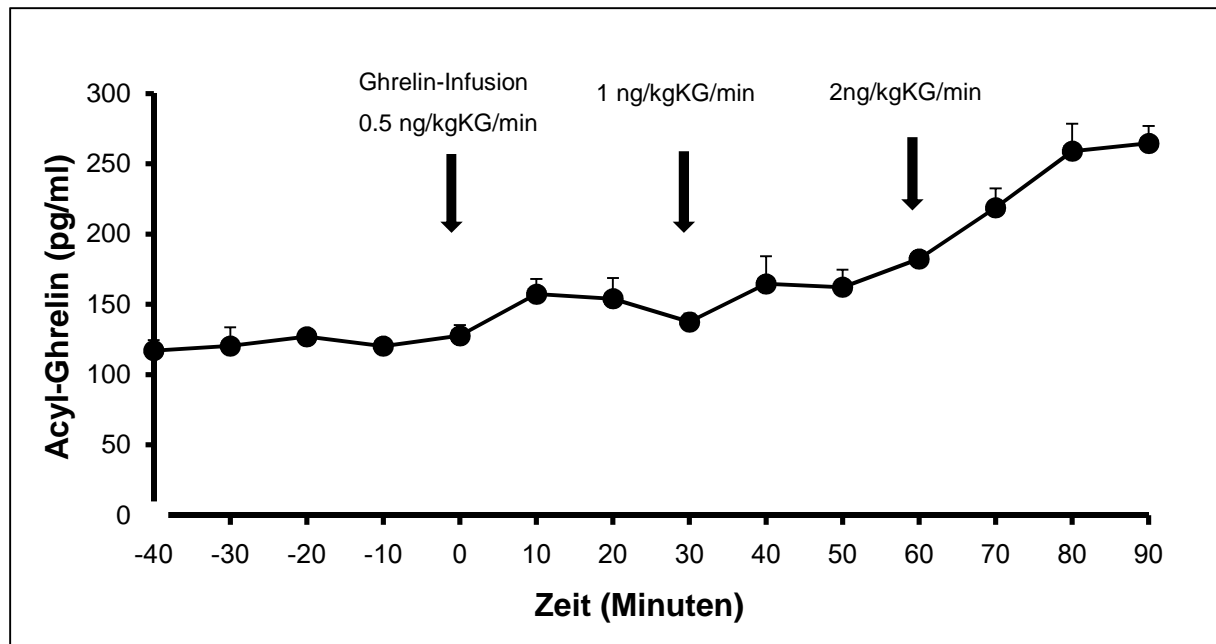


Abb. 8: Verlauf der Acyl-Ghrelinwerte in VS 2 während Infusion ansteigender Ghrelindosen (n=4). Bei 1 ng/kgKG/min zeigt sich ein Verlauf, der dem physiologischen postprandialen Anstieg am Nächsten kommt.

In Versuchsserie 3 wurde dann die ermittelte Konzentration von 1 ng/kg KG/min 4 Probanden über 90 min infundiert, um ihre Auswirkung auf die Plasma-Ghrelinspiegel zu verifizieren.

Die basalen Ghrelinwerte vor Ghrelinapplikation lagen gemittelt in den ersten 40 min bei $104 \pm 31,6$ pg/ml. Sie stiegen durch die kontinuierliche Infusion auf durchschnittlich $156 \pm 23,9$ pg/ml an. Es bestätigt sich also der in VS 2 bereits gezeigte Effekt, sodass diese Konzentration für die weiteren Versuche beibehalten wurde.

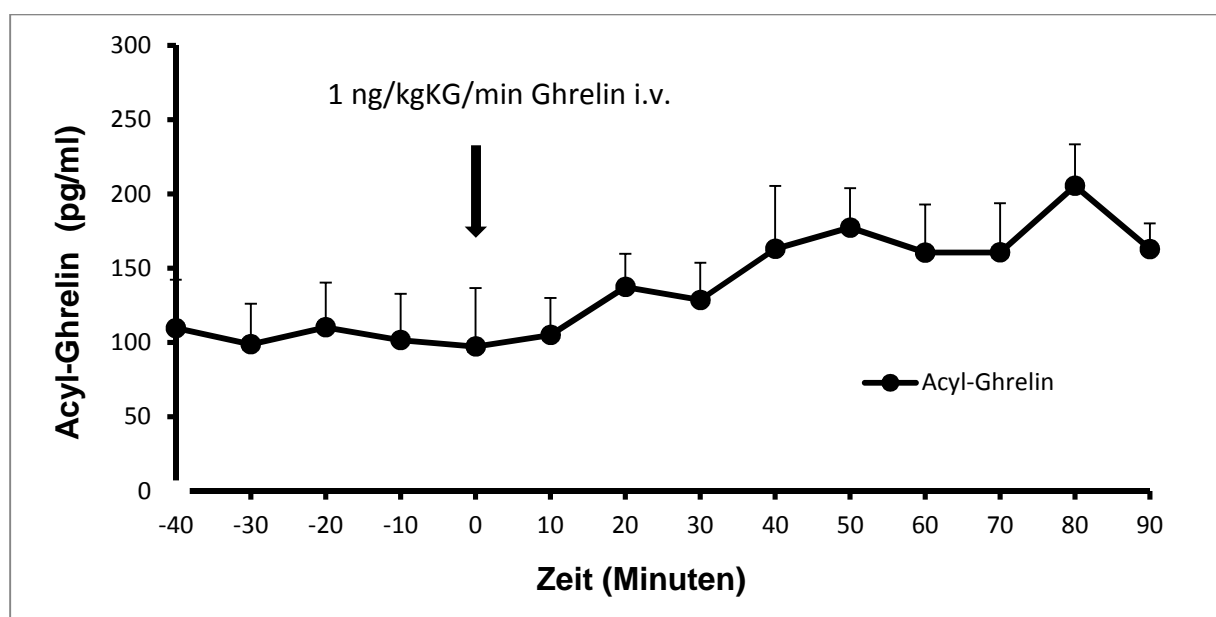


Abb. 9: Verlauf der Acyl-Ghrelinwerte in VS 3 während Infusion von 1 ng/kgKG/min (n=4).

3.3 VS 4: Vergleich Placebo vs. Ghrelininfusion

3.3.1 Basale Plasmalevel

Die basalen Plasmaspiegel der gemessenen Parameter aktives Ghrelin, Glucose, Insulin, Cortisol und Wachstumshormon waren innerhalb der Ruhephase von 40 min bei Placebo- und Verumgruppe bei den 20 Probanden nicht signifikant verschieden. Die entsprechenden Durchschnittswerte sind in Tabelle 2 angegeben.

	NaCl-Infusion	Ghrelin-Infusion	p-Wert
Basalwert Glucose (mg/dl)	98 ± 1.8	101 ± 1.8	n.s.
Basalwert Insulin (fU/ml)	2 ± 0.5	2 ± 0.7	n.s.
Basalwert Acyl-Ghrelin (pg/ml)	83 ± 7.7	78 ± 7.5	n.s.
Basalwert Cortisol (µg/dl)	15 ± 1.1	14 ± 1.2	n.s.
Basalwert Wachstumshormon (ng/ml)	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.3	n.s.

Tabelle 2: Basalwerte von Glucose, Insulin, Acyl-Ghrelin, Cortisol und Wachstumshormon der VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Die Daten sind als Durchschnittswerte ± SEM angegeben.

3.3.2 Acyl-Ghrelin

Während der Infusion von physiologischer Kochsalzlösung sanken die basalen Werte des aktiven Ghrelin von 83 ± 7.7 pg/ml auf minimal 52 ± 3.2 pg/ml 60 min postprandial ($p < 0.001$). Im Verlauf stiegen die Hormonwerte kontinuierlich an, blieben aber bis zum Zeitpunkt 210 min signifikant unter präprandialen Werten ($p < 0.05$).

Im Verum-Versuch zeigte sich ein ähnlicher Abfall des präprandialen Ghrelins von 78 ± 7.5 pg/ml auf 49 ± 3.6 pg/ml 60 min nach Verzehr des Frühstücks ($p < 0.001$). Zu diesem Zeitpunkt startete die Ghrelininfusion (1 ng/kg KG/min), was zu einem sofortigen Anstieg der Plasma-Spiegel führte. So wurden die basalen Werte bereits innerhalb von 10 Minuten erreicht. Ab 100 min waren sie signifikant erhöht im Vergleich zu präprandialen Werten ($p < 0.05$). Die maximalen Ghrelinwerte unter Ghrelininfusion betrugen 191 ± 11.7 pg/ml bei 300 min und waren somit 2.4 mal höher als basale Level.

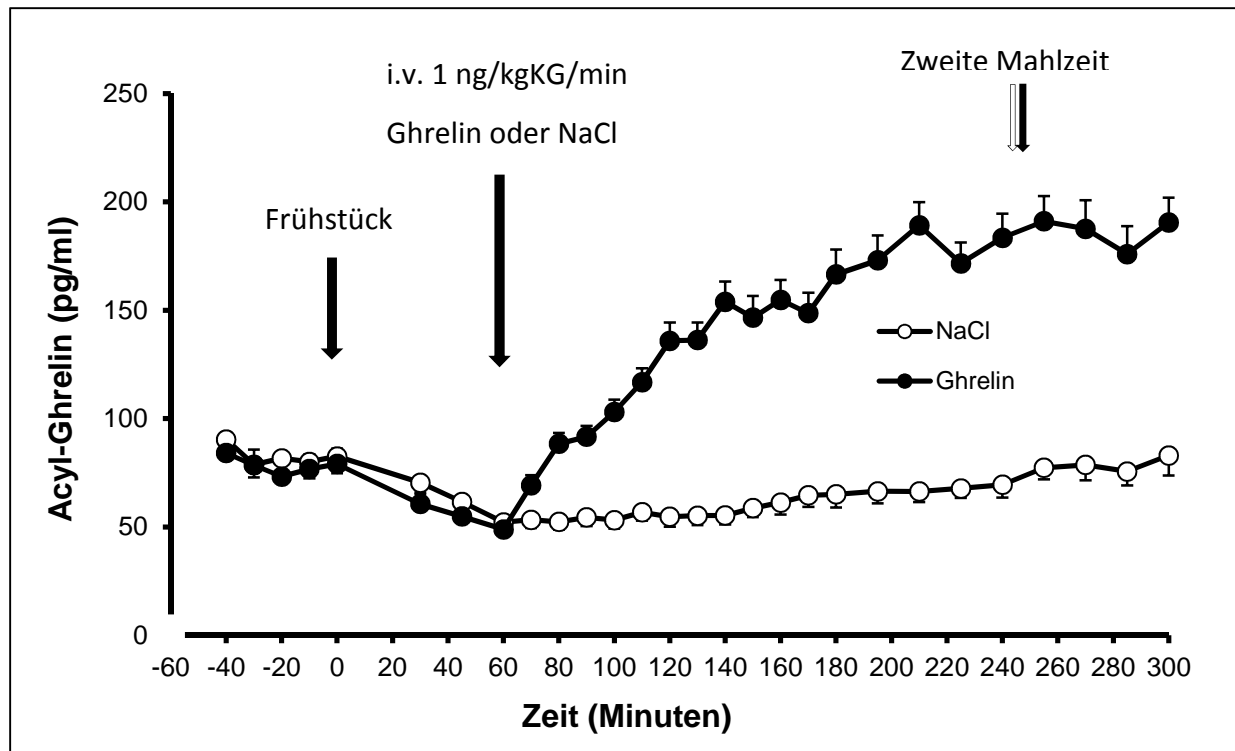


Abb. 10: Verlauf der Acyl-Ghrelinwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet.

3.3.3 Hunger und Sättigung, Kalorienaufnahme

Vergleicht man die basalen Hunger- und Sättigungswerte, zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Das präprandiale Hungergefühl lag unter NaCl-Infusion bei maximal 79 ± 2.5 mm, unter Ghrelininfusion bei maximal 76 ± 3.7 mm, das präprandiale Sättigungsgefühl bei 17 ± 2.5 mm bzw. 19 ± 3.9 mm.

Auch postprandial unterscheidet sich der Verlauf der beiden Graphen nicht signifikant.

Nach dem Frühstück konnte unter Placebo-Infusion ein Abfall des Hungergefühls auf minimal 8 ± 1.6 mm nach 30 min beobachtet werden. Im Verlauf stieg das Hungergefühl der Probanden wieder bis zu einem maximalen Level von 45 ± 5.4 mm nach 180 min an. Danach zeigte sich eine Plateauphase ohne signifikante Veränderungen bis zur Aufnahme der zweiten Mahlzeit.

Während der Ghrelin-Infusion kam es ebenfalls 30 min nach dem Frühstück zum maximalen Abfall des Hungergefühls auf 6 ± 1.5 mm. Hier erreichte der postprandiale Anstieg des Hungers Maximalwerte von 51 ± 5.5 mm zum Zeitpunkt 195 min und blieb ebenfalls auf diesem Niveau bis zur Einnahme der zweiten Mahlzeit stabil.

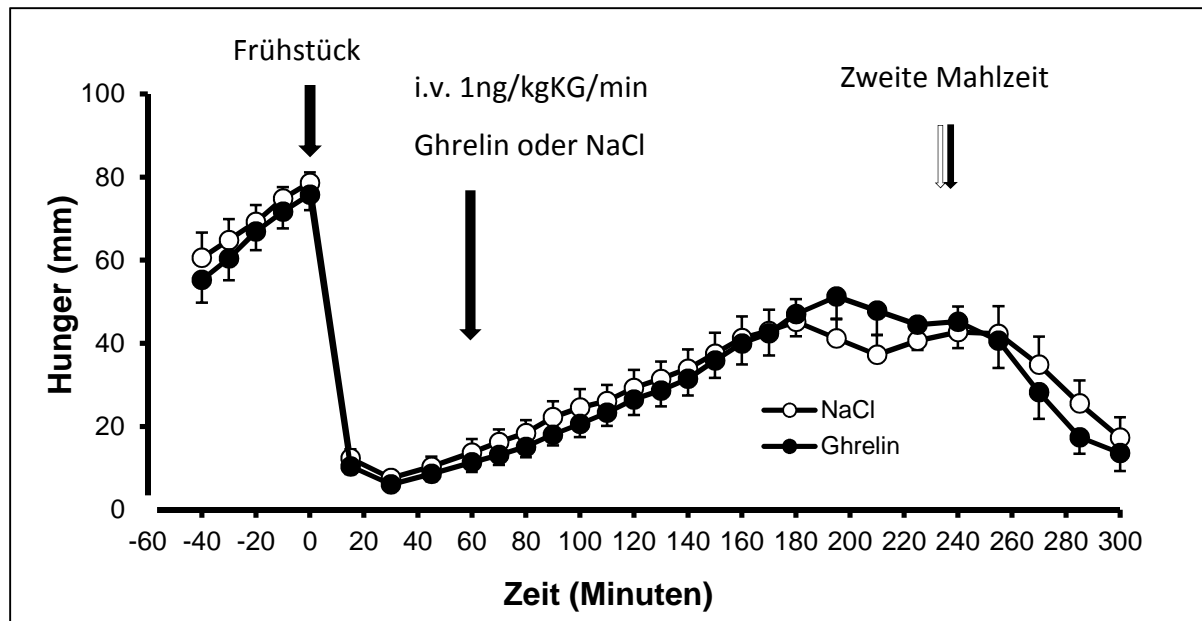


Abb. 11: Verlauf der Hungerratings in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet.

Auch das Sättigungsgefühl zeigte unter Verum bzw. Placebobedingungen einen annähernd identischen Verlauf. Das Sättigungsgefühl der Probanden stieg während NaCl-Infusion auf maximal 90 ± 3.9 mm 30 min nach dem Frühstück, um in der postprandialen Periode wieder auf minimal 52 ± 5.4 mm bei 180 min zu fallen. Im Verum-Versuch erreichte das Sättigungsgefühl ebenfalls nach 30 min ihr Maximum von 90 ± 3.1 mm, um dann ebenfalls kontinuierlich abzufallen. Bei beiden Versuchen zeigte sich in der Zeit vor der Einnahme der zweiten Mahlzeit eine Plateauphase ohne weiteren Abfall des Sättigungsgefühls.

Nach Nahrungsaufnahme zeigten sich im Ghrelin-Versuch signifikant erhöhte Sättigungswerte zum Zeitpunkt 270 und 285 von 74 ± 5.5 mm vs. 59 ± 7.4 mm und 83 ± 4.0 mm vs. 70 ± 6.1 mm. Bei den Hungerratings zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht.

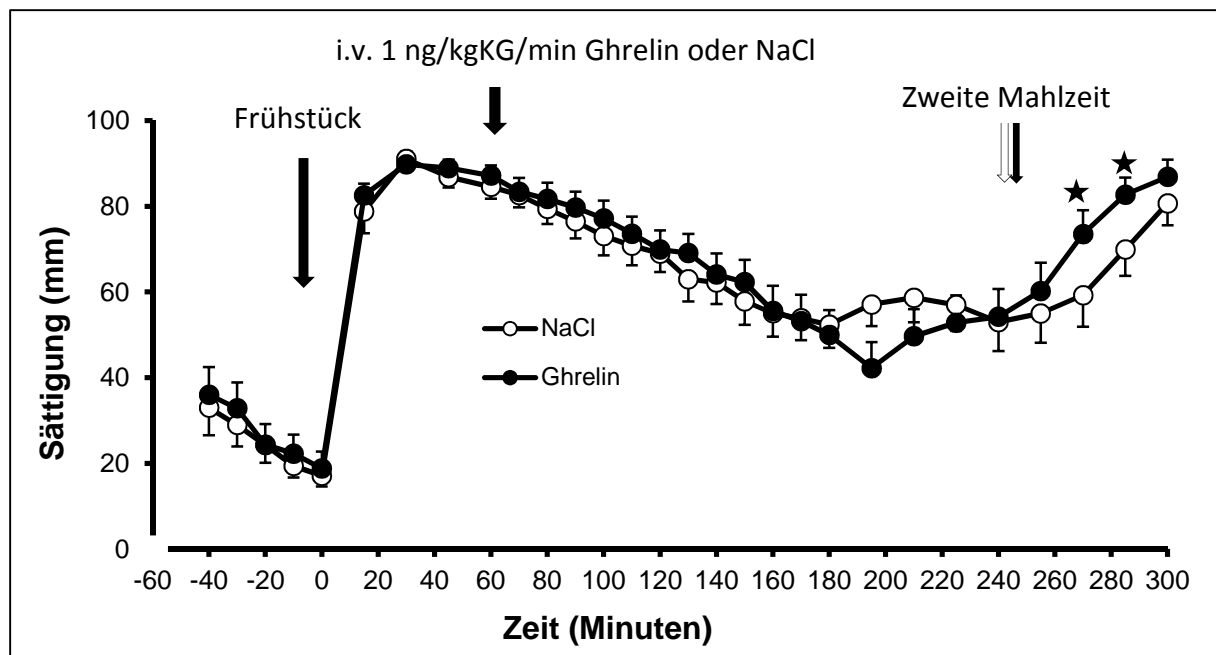


Abb. 12: Verlauf Sättigungsratings in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet. Man beachte den signifikant stärkeren Anstieg des Sättigungsgefühls in der Ghrelingruppe nach Einnahme der zweiten Mahlzeit. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen Signifikanz von $p < 0.05$ zwischen Werten unter Placebo- bzw. Ghrelininfusion.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit NaCl- und der mit Ghrelininfusion was die Menge und den Zeitpunkt der Aufnahme der zweiten Mahlzeit betrifft. Im Placeboversuch wurden die Sandwiches zum Zeitpunkt 244 ± 10.4 min gegessen, während sie im Verumversuch bei 247 ± 8.3 min verzehrt wurden.

Die Menge der aufgenommenen Nahrung betrug 1029 ± 113 kcal bei NaCl-Infusion, bzw. 1094 ± 90 kcal bei Ghrelin-Infusion (n.s.). Auch der Wasserkonsum unterschied sich mit 915 ± 60 ml, bzw. 961 ± 73 ml nicht signifikant.

	NaCl-Infusion	Ghrelin-Infusion	p-Wert
Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme (min)	244 ± 10.4	247 ± 8.3	n.s.
Menge der Nahrungsaufnahme (kcal)	1029 ± 113	1094 ± 90	n.s.
Wassermenge (ml)	915 ± 60	961 ± 73	n.s.

Tabelle 3: Zeitpunkt und Menge der aufgenommenen Nahrung sowie des verzehrten Wassers im Verum/Placebovergleich der VS 4 (n=20). Die Daten sind als Durchschnittswerte \pm SEM angegeben.

3.3.4 Glukose- und Insulin

Am Versuchstag der Kochsalzinfusion stiegen die Glukosewerte von basalen 98 ± 1.8 mg/dl zu maximal 126 ± 3.9 mg/dl 30 min nach dem Frühstück an. Sie unterschieden sich damit nicht signifikant von den Werten während Ghrelin-Infusion, von 101 ± 1.8 mg/dl basal und 124 ± 3.3 mg/dl maximal. 120-140 min nach dem Frühstück waren in beiden Versuchsgruppen die Glukosewerte nicht mehr signifikant erhöht.

Die Glukoselevel unterschieden sich bis 240 min nicht signifikant zwischen Kochsalz- und Ghrelininfusion. Jedoch kam es nach Einnahme der zweiten Mahlzeit zum Zeitpunkt 255, 270 und 300 min zu einer signifikanten Erhöhung der Glukosewerte während der Ghrelininfusion. Die Area under the curve von Glukose zwischen der 255. und 300. Minute war unter NaCl-Infusion 5630 ± 136.3 mg/dl x 60 min im Vergleich zu 6317 ± 206.5 mg/dl x 60 min während Ghrelininfusion, was einem p - Wert < 0.007 entsprach.

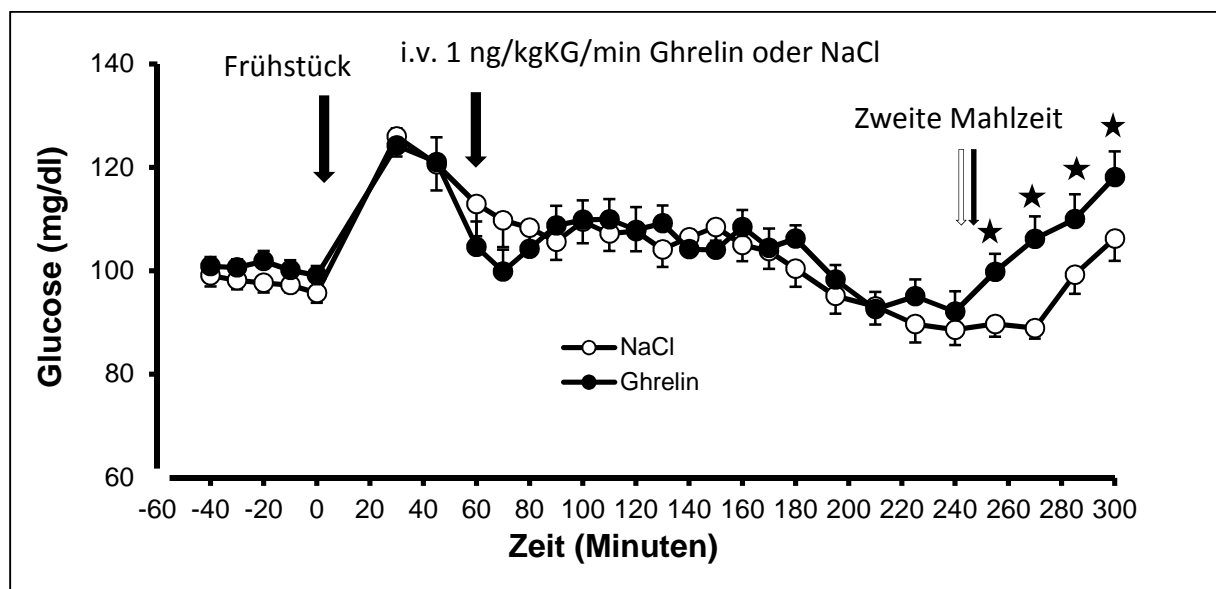


Abb. 13: Der Verlauf der Blutzuckerwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet. Man beachte, dass es aber nach Einnahme der zweiten Mahlzeit bei der Ghrelininfusion zu signifikant erhöhten Glukosewerten von 255 – 300 min im Placebovergleich kam. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen Signifikanz von $p < 0.05$ zwischen Werten unter Placebo- bzw. Ghrelininfusion.

Die Insulinwerte stiegen während NaCl-Infusion von basalen 2 ± 0.5 μ U/ml auf maximal 36 ± 4.6 μ U/ml 45 min nach dem Frühstück an, um nach 240 min wieder auf ein Minimum von 12 ± 3.2 μ U/ml zu fallen. Damit unterschieden sich die Insulinlevels nicht signifikant von denen während der Ghrelininfusion, wo sich basale Werte von 2 ± 0.7 μ U/ml auf maximal 36 ± 5.5

$\mu\text{U/ml}$ steigerten, welche nach 240 min auf dieselben Werte wie im Placeboversuch zurückkehrten.

Nach Einnahme der Sandwichmahlzeit zeigte sich ein Trend zu höheren Insulinwerten unter Ghrelininfusion, jedoch konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden. Die Area under the Curve im Zeitraum 240 – 300 min war während NaCl-Infusion $787 \pm 145.7 \mu\text{U/ml} \times 60\text{min}$, während sie unter Ghrelin-Infusion $934 \pm 173 \mu\text{U/ml} \times 60\text{min}$ ergab (n.s.).

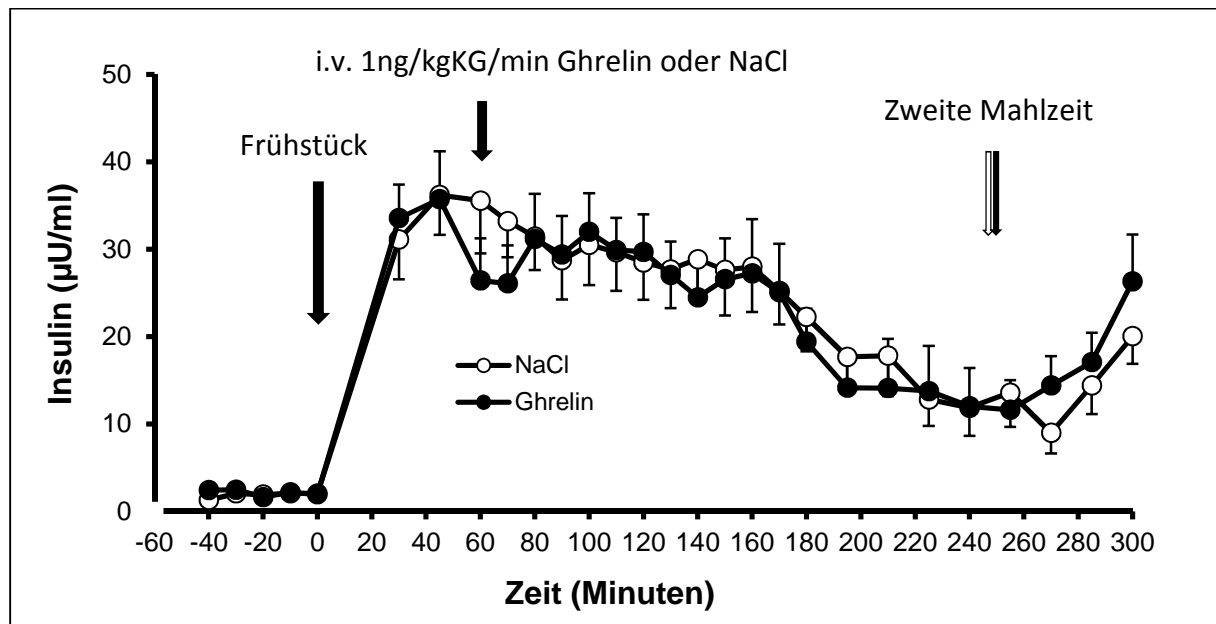


Abb. 14: Der Verlauf der Insulinwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet.

3.3.5 Cortisol- und Wachstumshormon

Die während der Kochsalzinfusion gemessenen Cortisolwerte unterschieden sich nicht signifikant von denen während Ghrelininfusion – auch nicht nach Einnahme der zweiten Mahlzeit. Die morgendlichen präprandialen Werte waren in beiden Gruppen mit $14.6 \pm 1.07 \mu\text{g/dl}$ (NaCl) bzw. $13.9 \pm 1.19 \mu\text{g/dl}$ (Ghrelin) physiologisch erhöht und fielen postprandial auf minimal $5.61 \pm 0.43 \mu\text{g/dl}$ unter NaCl-Infusion bzw. $5.60 \pm 0.49 \mu\text{g/dl}$. Die Area under the curve zwischen 240-270 min betrug für Cortisol $425 \pm 31.1 \mu\text{g/dl} \times 60\text{min}$ in der NaCl-Gruppe, während sie in der Ghrelin-Gruppe $426 \pm 36.3 \mu\text{g/dl} \times 60\text{min}$ ergab (n.s.).

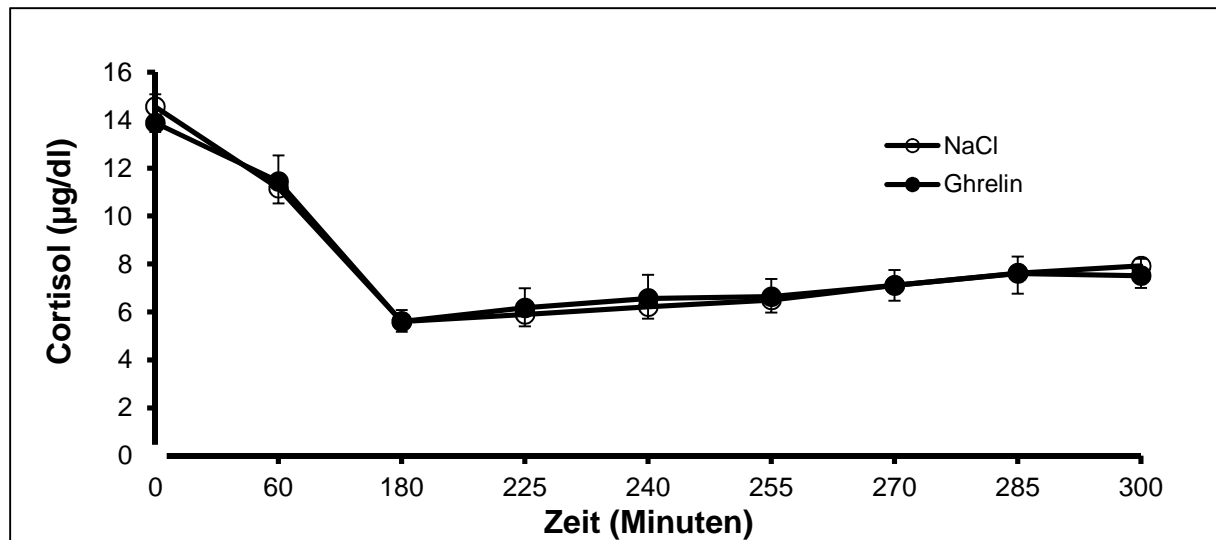


Abb. 15: Der Verlauf der Cortisolwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20).

Die basalen Spiegel von GH waren in beiden Gruppen ähnlich, bei 0.7 ± 0.27 ng/ml bei NaCl-Infusion, bzw. 0.8 ± 0.33 ng/ml im Ghrelinversuch.

Die Werte für das Wachstumshormon fielen dann während der NaCl-Infusion auf 0.1 ± 0.01 ng/ml zum Zeitpunkt 60 min. Auf diesem Niveau blieben sie für den restlichen Versuchsablauf stabil und änderten sich nicht signifikant.

Während Ghrelin-Infusion stiegen die GH-Spiegel jedoch signifikant von 0.1 ± 0.01 ng/ml bei 60 min auf ein Maximum von 0.9 ± 0.43 ng/ml bei 255 min an ($p = 0.039$ im NaCl-Vergleich). Dies ergab eine AUC im Zeitraum 240-300 von 13 ± 5.2 ng/ml x 60 min während Kochsalzinfusion, bzw. von 42 ± 18.1 ng/ml x 60 min ($p = 0.034$) während Ghrelininfusion.

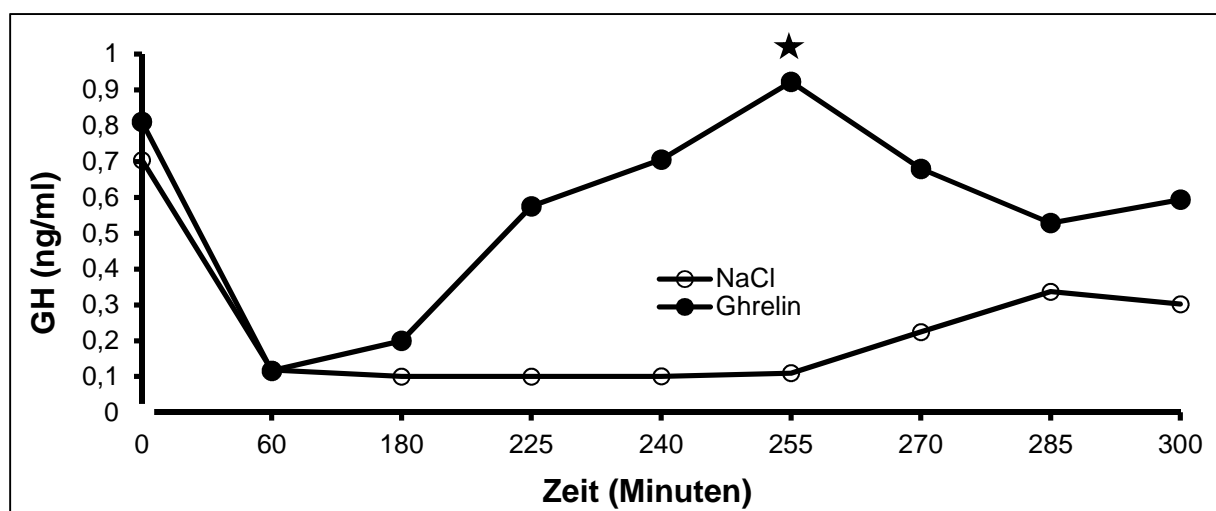


Abb. 16: Der Verlauf der GH-Spiegel in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Während Ghrelininfusion zeigen sich signifikant erhöhte Wachstumshormonwerte. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen Signifikanz von $p < 0.05$ zwischen Werten unter Placebo- bzw. Ghrelininfusion.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

4.1.1 Ghrelin – Synthese, Struktur, Rezeptor

Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist das gastrointestinale Hormon Ghrelin, welches 1999 von der japanischen Forschungsgruppe um Kojima entdeckt wurde [22].

Es handelt sich um ein Peptidhormon aus 28 Aminosäuren, dessen humane Form sich vom Rattenghrelin nur durch zwei Aminosäuren unterscheidet. Es entsteht aus einem 117 Aminosäuren langen Prä-Prohormon [61].

Die höchste Ghrelinproduktion konnte im säureproduzierenden Bereich des Magenfundus nachgewiesen werden, wobei es im gesamten Gastrointestinaltrakt sezerniert wird. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass die Plasmaghrelinspiegel nach Gastrektomie sofort um bis zu 70 % absinken [62]. Bei den ghrelinausschüttenden Zellen handelt es sich um sog. X/A-Zellen, die einen Anteil von 20% der endokrinen Zellen des Magen-Darmtraktes ausmachen [23]. Außerdem konnten wenige ghrelinproduzierende Zellen auch im Nucleus Arcuatus des Hypothalamus nachgewiesen werden, sodass man davon ausgeht, dass das Hormon sowohl durch den großen Kreislauf als auch über das Hypophysenportadersystem an den Ort seiner Wirkung gelangt [63]

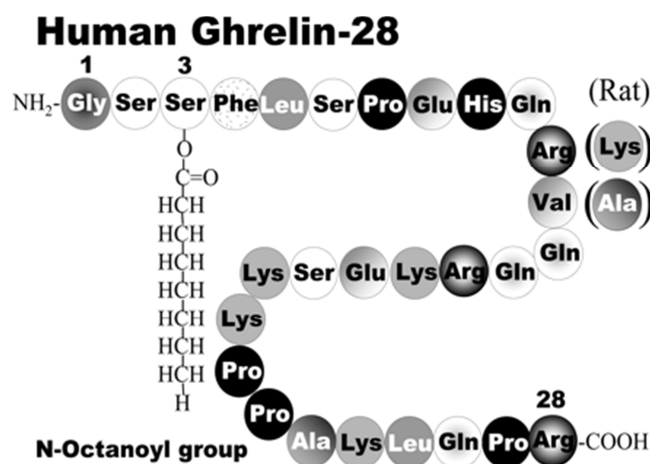


Abb. 17: Das Peptidhormon Ghrelin. Man beachte die N-Octanoyl-Gruppe an Serin 3 [64]

Um Ghrelin in seine biologisch aktive Form zu verwandeln, wird das Serin an Stelle 3 mit Oktansäure, mittels des erst kürzlich entdeckten, membranständigen Enzyms Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) verestert [65]. Man geht davon aus, dass im Blutplasma ca. 3-4% des gesamten Ghrelins in der acetylierten aktiven Form vorliegen [66]. Im Magen hingegen ist der Anteil des aktiven Ghrelins mit einem Verhältnis von acetyliertem zu unacetyliertem Ghrelin von 1:3 sehr viel höher [61]. Diese Modifizierung macht das Ghrelinmolekül lipophiler und trägt dazu bei, dass es die Bluthirnschranke überwinden kann [67] und eine G-Proteingekoppelte Aktivierung am GH secretagogue receptor (GHS-R), einem Rezeptor, über den die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) aus der Hypophyse gesteuert wird, bewirken kann [31]. Bereits 1996 wurde dieser Rezeptor GHS-R in Hypophyse, Hypothalamus und Hippocampus nachgewiesen, in geringerer Menge auch in Herz, Pankreas, Milz und Schilddrüse [68, 69]. Ghrelin bindet hierbei v.a. an die Isoform 1a dieses Rezeptors (GHS-R1a). Schon Jahre vorher wurden künstliche Peptide, sog. Growth Hormone Releasing Secretagogues (GHSs) bekannt, die an diesen Rezeptor binden und die GH-Ausschüttung stimulieren [70]. Ghrelin konnte schließlich als endogener Ligand dieses Rezeptors identifiziert werden [71]. Aufgrund dieser Eigenschaften konnte somit gezeigt werden, dass Ghrelin, neben dem GH-Releasing Hormone (GH-RH) und Somatostatin, in die Regulation der Ausschüttung von Wachstumshormon einwirkt [72]. Bindet Acyl-Ghrelin an den GHS-R, kommt es zu einer Phospholipase C-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, außerdem werden Kaliumkanäle gehemmt, was einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom aus spannungsabhängigen L-Kanälen bedingt und somit schließlich die GH-Ausschüttung auslöst [73]. Man kann hierbei von einer ähnlich starken GH-ausschüttenden Potenz von Ghrelin und GHRH ausgehen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde es nach der indogermanischen Silbe „ghre“ für „to grow“ und nach dem Englischen „Growth Hormone Release Inducing“ in Ghrelin benannt [22].

4.1.2 Ghrelin – Auswirkungen auf die zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme

Hunger und Sättigung wird durch komplexe zentrale Mechanismen, v.a. im Hypothalamus, aber auch im Hirnstamm reguliert. Dabei spielen zum einen zentrale Signale durch lokal produzierte Mediatoren, wie z.B. Neuropeptid Y, Melanocortin, Agouti-related protein, Dopamin, Endocannabinoide uvm. eine große Rolle, aber auch zentral wirksame, peripher ausgeschüttete Hormone, wie z.B. Leptin, Insulin, Ghrelin, Peptid YY u.a. wirken in die Nahrungsaufnahme ein [74].

Leptin z.B. wird im Fettgewebe gebildet und sendet abhängig von der Füllung der Adipozyten ein hungerdämpfendes Signal an den Hypothalamus, d.h. hohe Leptinspiegel sind ein Zeichen der Überernährung [75]. Somit gilt es als „Gegenspieler“ von Ghrelin.

Bis zur Entdeckung von Ghrelin kannte man kein hungerauslösendes Signal, das von peripheren Geweben stammt.

Man geht davon aus, dass Ghrelin v.a. im Bereich des Nucleus arcuatus des Hypothalamus seine Wirkung entfaltet. Es gibt hier zwei verschiedene Arten von Neuronen, die eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme spielen. Zum einen die Hunger auslösendes Neuropeptid Y (NPY) und agouti-related protein (AGRP) produzierenden Zellen und zum anderen Neurone, die pro-opiomelano-cortin (POMC) und cocaine-and amphetamine-related transcript (CART) ausschütten, die den Hunger eher unterdrücken [76]. Cowley et al. zeigten, dass Ghrelin-exprimierende Neurone v.a. im Nucleus arcuatus und in einer Zellgruppe nahe dem dritten Ventrikel zu finden sind. Von hier ziehen Efferenzen zu den NPY, AGRP, POMC und Corticotropin-releasing hormone (CRH) ausschüttenden Zellen des Hypothalamus. Hier scheint Ghrelin in die Hunger- und Sättigungsregulation einzugreifen, da es über diese Verbindung die Ausschüttung von NPY und AGRP via GHS-Rezeptor stimuliert und hierüber die Nahrungsaufnahme zu verstärken scheint [77]. Außerdem scheint Ghrelin die POMC-haltigen Neurone zu inhibieren und somit die Freisetzung des anorektischen Peptids α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) herabzusetzen [78].

Im Tierversuch fand man heraus, dass eine intrathekale Ghrelininjektion nicht nur den Nucleus arcuatus, sondern auch den Nucleus paraventricularis und den lateralen Hypothalamus aktiviert. Hier befinden sich Neurone, in denen das orexigen, also hungerstimulierend wirkende Orexin A und B produziert wird [79, 80]. In-vitro konnte gezeigt werden, dass Ghrelin direkt diese Neurone stimuliert und im Tiermodell konnte der hungerauslösende Effekt von Ghrelin durch Anti-Orexin Antikörper antagonisiert werden [81]. So geht man davon aus, dass Ghrelin auch via Orexin die Nahrungsaufnahme stimuliert. Zudem wirkt Ghrelin möglicherweise über den Nervus vagus appetitsteigernd, da man im Ganglion Nodosum von Ratten und Menschen den Ghrelinrezeptor nachgewiesen hat, was eine Signalübertragung vom Magen zum ZNS über afferente Neurone wahrscheinlich macht [82]. Jedoch ließ sich dies nicht in allen Studien eindeutig beweisen.

4.1.3 Ghrelin – Auswirkungen auf die Energiebilanz

Neben einer kurzfristigen Beeinflussung des Hunger- und Sättigungsgefühl scheint Ghrelin auch eine Rolle in der Regulation der längerfristigen Energiehomöostase zu spielen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Plasma-Ghrelinwerte negativ mit dem BMI der zugehörigen Person korrelieren. Denn verschiedene Studien zeigten, dass adipöse Personen erniedrigte bzw. schlanke Personen erhöhte Ghrelinspiegel im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden aufweisen [27, 83-87].

Es wurde auch deutlich, dass eine Gewichtszunahme zur Erniedrigung der basalen Ghrelinwerte führt. Diesen Effekt sieht man auch bei Patienten mit Anorexia nervosa, die wieder an Gewicht zugenommen hatten [88, 89]. Ebenso führt eine Gewichtsabnahme, sei es durch Nahrungsrestriktion oder durch andauerndes körperliches Training, aber auch durch das Erreichen kachektischer Zustände im Laufe von Magersucht, Herzerkrankungen, Lungen-, Brust- und Darmkrebs, zum Anstieg des basalen Plasma-Ghrelins [90-94]. Es scheint also, als würden die jeweiligen Ghrelinspiegel dem Hypothalamus eine Auskunft über den Ernährungszustand des Körpers geben.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Ghrelin in die Regulation der Energiebilanz einwirkt, ist die Tatsache, dass bei Patienten mit Prader-Willi-Syndrom, einer genetische Erkrankung, die u.a. mit geistiger Retardierung, pathologisch gesteigerter Nahrungsaufnahme und verminderter GH-Ausschüttung einhergeht, stark erhöhte basale Ghrelinwerte gefunden werden [85, 95, 96]. Bei diesen Patienten fehlt jedoch der postprandiale Ghrelinabfall. Wie sich diese beiden Faktoren gegenseitig bedingen, d.h. ob die Adipositas durch die hohen Ghrelinspiegel bedingt ist, oder ob die hohen Ghrelinspiegel durch die Adipositas ausgelöst werden, ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen [95, 97].

Im Tierversuch an Ratten konnte durch langfristige Ghrelinadministration über zwei Wochen hinweg eine Gewichtszunahme durch verminderte Fettutilisation erreicht werden. Außerdem zeigte sich eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten [24, 98]. Dies scheint ein weiterer Hinweis darauf zu sein, dass Ghrelin orexigen wirkt und in die Energiehomöostase eingreift. Um die physiologische Rolle Ghrelins in der Nahrungsaufnahme klarer werden zu lassen, hat man diverse Studien mit Ghrelin knock-out Mäusen durchgeführt. Jedoch zeigten diese nicht eindeutig, inwieweit Ghrelin auf die Regulation der Nahrungsaufnahme einwirkt [99-102]. So konnten Sun et al. bei Mäusen ohne eigene Ghrelinproduktion keine Unterschiede insbesondere bezüglich Fettablagerungen, Körpergröße, Körpergewicht und Menge der Nahrungsaufnahme im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen feststellen. Mäuse, denen Ghrelin fehlt, reagieren außerdem, genauso wie normale Mäuse, mit gesteigertem Appetit auf exogene

Ghrelingabe und mit Übergewicht auf fettreiche Diät [99]. Diese Ergebnisse stellen die Rolle Ghrelins als zentralen Regulator der Nahrungsaufnahme stark in Frage. Andere Studien stimmten hiermit überein, fanden jedoch zusätzlich heraus, dass in Ghrelin knock-out Mäusen eine vermehrte Fettutilisation zur Energiegewinnung stattfindet [101]. Dem widerspricht eine Untersuchung von Zigman et al., die feststellte, dass Mäuse mit fehlendem GHSR durch fettreiche Diät weniger Gewicht zunehmen als der Wildtyp, was wiederum für die Rolle Ghrelins in der Regulation der Energiehomöostase spricht [102].

4.2. Spezielle Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigten zum ersten Mal, dass eine niedrig-dosierte Ghrelin-Infusion weder Einfluss auf den Zeitpunkt, noch auf die Kalorienmenge der aufgenommenen Mahlzeit hat. Wir können also bisherigen Publikationen, deren Ergebnisse postulierten, dass Ghrelin Hunger und Nahrungsaufnahme positiv beeinflussen, nicht zustimmen. Was uns grundsätzlich von vorherigen Arbeiten unterscheidet, ist, dass wir einen sehr physiologischen Ansatz verfolgten, indem wir die Ghrelininfusion zum Nadir der endogenen Ghrelinausschüttung starteten und dabei zudem die niedrigste Dosis verwendeten, die bisher in der Literatur angegeben wurde [38-41, 47, 49].

4.2.1 Endogenes Ghrelin – Auswirkungen auf Hunger und Nahrungsaufnahme

In vielen Studien, wie auch in unserer, konnte nachvollzogen werden, dass endogene Plasmaghrelinwerte postprandial absinken und nach einer Talsohle wieder ansteigen, um vor einer weiteren Mahlzeit wieder ihr Maximum zu erreichen. Hieraus folgerten Cummings et al. 2004, dass dieser präprandiale Anstieg eine große Rolle im Anstoß zur nächsten Nahrungsaufnahme spielt. Sie zeigten, dass der maximale Anstieg des Ghrelins dem maximalen Hunger um ein kurzes Intervall vorausgeht [54].

Die Literatur ist diesbezüglich aber nicht eindeutig [55, 56, 103]. So konnten Erdmann et al. nachweisen, dass zwar eine signifikante Korrelation zwischen Hunger und Ghrelinwerten besteht, aber auch, dass die absolute Höhe der präprandialen Ghrelinlevel keinen Einfluss auf die später aufgenommene Nahrungs- und Kalorienmenge hat [56]. Darüber hinaus unterscheidet sich der Verlauf der Ghrelinwerte im Verhältnis zur entsprechenden Hungerentwicklung in Abhängigkeit von den aufgenommenen Makronährstoffen. So war ein ähnlicher Hungeranstieg sowohl nach einem kohlenhydratreichen Essen, welches zu einem

postprandialen Ghrelinabfall führte, als auch nach einer fett- bzw. proteinreichen Mahlzeit zu beobachten, die hingegen zu ansteigenden Ghrelinwerten führte. [55]. Diese Erkenntnisse stellen natürlich Ghrelins Rolle in der Initiation der Nahrungsaufnahme in Frage.

Interessanterweise fehlte bei adipösen Patienten mit basal erniedrigten Ghrelinwerten ebenfalls das postprandiale Absinken der Ghrelinwerte, auch nach einem kohlenhydratreichen Essen [104].

Unsere aktuelle Studie demonstriert unter anderem, dass das Verlangen zur Nahrungsaufnahme ca. 30 min nach Erreichen der basalen Ghrelinwerte, ohne exogene Ghrelininfusion, wiederkehrt, was eher mit dem Konzept übereinstimmen würde, das davon ausgeht, dass Ghrelin an der Initiation der Nahrungsaufnahme mitwirkt.

4.2.2. Exogene Ghrelinapplikation

4.2.2.1. Zeitpunkt des Infusionsbeginns

Im Gegensatz zu den meisten anderen gastrointestinalen Hormonen steigt Ghrelin nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit nicht an, sondern fällt ab. Deshalb bedarf es einer speziellen Herangehensweise, um diese physiologischen Verhältnisse nachzuahmen. Dementsprechend wurde in dieser Studie die niedrig dosierte Ghrelin-Infusion am Nadir der physiologischen Ghrelinspiegel, 60 min postprandial, gestartet, um genau herauszufinden, ob hierdurch Hunger und der Wunsch zur Nahrungsaufnahme früher wiederkehren oder verstärkt werden. Die meisten anderen Studien, die mit Ghrelininfusionen arbeiteten, starteten diese vor oder zum Zeitpunkt der Einnahme der Mahlzeit [38, 39, 43, 45, 47, 48] bzw. ließen die Probanden nüchtern [36, 40, 44, 46, 50, 53]. Hierbei ist zu beachten, dass bei Betrachtung der Hungerwerte auf den VAS nach nächtlichem Fasten im nüchternen Zustand durchwegs sehr hohe Werte erhoben werden. Dass diese durch eine weitere Fastenperiode – mit und ohne Ghrelininfusion – schwer zu steigern sind, leuchtet ein. Es ist also fraglich, ob Studien, bei denen Probanden durchwegs nüchtern bleiben, wirklich den durch Ghrelininfusion induzierten Hunger von dem physiologischen unterscheiden können.

4.2.2.2. Zeitpunkt und Menge der zweiten Mahlzeit

Neary und Mitarbeiter verfolgten einen uns ähnlichen Ansatz, indem sie die i.v. Ghrelinadministration 90 min nach einem standardisierten Frühstück begannen und den Probanden eine unbegrenzte Menge einer zweiten Mahlzeit zur Verfügung stellten.

Allerdings wurde dieses Mittagessen – im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau – zu einem fixen Zeitpunkt 90 min nach Infusionsbeginn gereicht, was den freien Willen zur Nahrungsaufnahme der Probanden natürlich nicht berücksichtigte. Zudem war die infundierte Ghrelinmenge 17fach höher als unsere [41]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien, die die Hungerentwicklung bzw. Nahrungsaufnahme durch Ghrelininfusion untersuchten, ließen wir die Probanden sowohl Zeitpunkt als auch Menge der zweiten Mahlzeit frei wählen, um jegliche Beeinflussung durch äußere Einflüsse zu vermeiden. Andere Studien setzten meist den Zeitpunkt [40, 41, 45, 47, 50] bzw. Zeitpunkt und Menge [39, 48] fest, oder dokumentierten lediglich das veränderte Hungergefühl [36, 38, 46, 53], ohne dies mit einer Testmahlzeit zu bestätigen. Wir denken, dass durch die Methode, die wir verwendeten, welche den Probanden die Nahrungsaufnahme, sowohl was die Menge als auch den Zeitpunkt betrifft, frei von jeglichen äußeren Einflüssen überlässt, der Ghrelin-induzierte Effekt bestmöglich untersucht werden kann.

4.2.2.3. Kontinuierliche vs. Bolus-Applikation

Was uns ebenfalls von vielen anderen Studien unterscheidet, ist die Tatsache, dass wir eine kontinuierliche Ghrelininfusion und keine Bolusapplikation verwendeten, da diese eher dem physiologischen Anstieg der Ghrelinkonzentration ähnelt. Unsere und diverse bisherige Studien zeigten, dass endogenes Plasmaghrelin nach seinem Nadir postprandial kontinuierlich ansteigt, sodass eine kontinuierliche Gabe eher einem physiologischen Anstieg entspricht. Außerdem beträgt die Halbwertszeit von acetyliertem Ghrelin im menschlichen Organismus nach i.v. Gabe ca. 9-21 min, sodass durch Bolusgaben nur ein sehr kurzer Konzentrationspeak erreicht werden kann und keine andauernde Erhöhung der Plasmaghrelinspiegel [51, 105].

4.2.2.4. Applizierte Ghrelindosis, erreichte Plasmaspiegel

Wir verwendeten in unserer Untersuchung eine Konzentration von 1ng/kgKG/min, die niedrigste bisher bekannte Dosis kontinuierlicher Ghrelininfusion. In den Vorversuchen testeten wir auch niedrigere und höhere Dosen, jedoch kam die verwendete Dosis dem physiologischen postprandialen Ghrelinanstieg am nächsten.

Die meisten bisherigen Studien, die Veränderungen von Hunger und Nahrungsaufnahme durch kontinuierliche Infusion von Ghrelin untersuchten, applizierten 17ng/kgKG/min (± 5 pmol/kgKG/min) [41, 45-47, 53] bis maximal 50.7ng/kgKG/min (± 15 pmol/kgKG/min)

[39]. Die niedrigste bisher verwendete Dosis betrug 3.37ng/kgKG/min (\cong 1pmol/kgKG/min), welche interessanterweise bei normalgewichtigen Personen ebenfalls keinen Effekt auf Hunger und Nahrungsaufnahme zeigte [40].

Diese Infusionen führten zu deutlich supraphysiologischen Konzentrationen von totalem Ghrelin mit Werten von maximal 2500 pg/ml bei der niedrigsten Dosis von 3.37 ng/kgKG/min [40] bis hin zu 5000 pg/ml. Die basalen Total-Ghrelinwerte waren meist relativ hoch im Bereich von 700-1500 pg/ml, was wohl durch den präprandialen nüchternen Zustand bedingt war [38, 46, 48, 49].

Einige Studien bestimmten wie wir die Plasmaspiegel acetylierten Ghrelins während der Ghrelininfusion. Hier zeigte sich ein Anstieg von basalen Werten zwischen 37 und 82 pg/ml auf ein Maximum von 900-2300 pg/ml [34, 43, 50, 51], wobei die basalen Werte mit den von uns gemessenen (83 pg/ml) übereinstimmen. In unseren Untersuchungen kam es jedoch maximal zu Werten von 191 pg/ml während Ghrelinadministration. Obwohl unsere Maximalwerte deutlich niedriger als in anderen Untersuchungen waren, konnten auch wir nur eine kurze Zeit physiologische Ghrelinwerte während der Infusion erreichen, bevor es zu deutlich supraphysiologischen Konzentrationen kam.

Die präprandialen Ghrelinkonzentrationen nach einer 12-stündigen Fastenperiode spiegeln bereits die maximale endogene Ghrelinproduktion wieder, sodass durch die Ghrelininfusionen sehr deutlich supraphysiologische Konzentrationen geschaffen wurden.

4.2.2.5. Einfluss auf Hunger und Nahrungsaufnahme

In verschiedensten Studien am Menschen zeigte sich, dass durch die Verabreichung von Ghrelin Hungergefühl und Nahrungsaufnahme verstärkt werden [34-41, 43, 47]. Einige davon zeigten aber auch, dass Ghrelininfusion nur die Nahrungsaufnahme verstärkt, jedoch keinen Einfluss auf das subjektive Hungergefühle hat [37, 40, 41, 45]. Andere Arbeiten hingegen konnten, obwohl sie ähnliche Ghreлиндosen verwendeten, diese Ergebnisse nicht reproduzieren [46, 48, 53, 106].

Unsere Studie, die gezielt den Effekt von niedrig dosiertem Ghrelin sichtbar machen wollte, zeigte, dass sich im Placebovergleich kein Unterschied bezüglich Hunger – und Sättigungsentwicklung, sowie Zeitpunkt und Menge der Nahrungsaufnahme ergeben hat. Dies stellt einen physiologischen Einfluss von peripherem Ghrelin auf die Regulation der Nahrungsaufnahme in Frage. Unsere Ergebnisse würden die Daten der bereits erwähnten

Studien mit Ghrelin knock-out Mäusen unterstützen, die ebenfalls zeigten, dass ein Fehlen von Ghrelin keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat [99, 101, 102].

Interessanterweise zeigte die Gruppe um Druce, dass eine ziemlich niedrige Ghrelindosis von 3.37ng/kg KG/min – also nur ca. 3 mal so hoch wie unsere – die Nahrungsaufnahme von adipösen Probanden stimulieren konnte, während dies keinen Effekt auf Normalgewichtige hatte [40]. Wie schon erwähnt, sind basale Ghrelinspiegel bei Adipösen niedriger als bei schlanken Personen [27, 28, 45, 83-87], sodass man spekulieren kann, ob das injizierte Ghrelin bei ihnen größeren Effekt hat, weil ihre Ghrelinrezeptoren durch die niedrigen basalen Spiegel vielleicht eine höhere Sensitivität besitzen. Demnach wäre es durchaus denkbar, dass die niedrige Ghrelindosis, die wir in der aktuellen Studie verwendeten, auch einen hungerstimulierenden Effekt auf adipöse Probanden gehabt haben könnte. Dies muss jedoch weiter untersucht werden.

4.2.2.6 Auswirkungen auf Glukose und Insulin, Cortisol und Wachstumshormon

In unserer Untersuchung kam es unter Ghrelininfusion nach der zweiten Mahlzeit zu signifikant erhöhten Glukosewerten im Placebo-Vergleich. Dieser Effekt lässt sich jedoch bisher schwer erklären. In früheren Studien sowohl am Mensch als auch am Tier, hat sich, wie bereits erwähnt, gezeigt, dass Ghrelin einen stimulierenden Effekt auf die Magenmotilität hat [107] und sowohl die Magenentleerung [38, 39, 108], als auch die Darmpassage beschleunigt [109-111]. Aufgrund dieser Effekte könnte es sein, dass die ingestierten Kohlehydrate schneller im Dünndarm absorbiert werden können, was wiederum in höheren postprandialen Glukosewerten mündet [112, 113].

Diverse Studien belegen, dass Ghrelin in höheren Dosen die GH - und Cortisolausschüttung stimuliert [46, 114-116]. Selbst durch unsere niedrig dosierte Infusion von 1 ng/kg KG/min wurden die GH-Sekretion gesteigert, wohingegen die Cortisolspiegel gleich blieben.

Diese Effekte könnten ebenfalls ein Grund für die durch Ghrelin veränderten Glukosewerte nach der zweiten Mahlzeit sein, da bekannt ist, dass das Wachstumshormon eine Erhöhung der Plasmaglucosespiegel induziert [117]. Jedoch bedarf es hier detaillierterer Studien mit verschiedenen Dosen, um wirklich einen physiologischen Effekt abgrenzen zu können.

Bezüglich der Insulinausschüttung ist die Literatur widersprüchlich [118], ob es durch Ghrelin zu einer Erhöhung [119-121] oder Erniedrigung [116, 122] oder auch gar keinem Effekt [123] kommt. Broglio et al. zeigten, dass durch eine Bolus Gabe von 1 µg/kg Ghrelin die Plasmaglukose erhöht und gleichzeitig die Insulinsekretion vermindert werden konnte. Auch korrelieren basale Ghrelinlevel invers mit den basalen Insulinspiegeln [87]. In anderen Tier-

und Humanstudien konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der Plasmainsulinwerte nach exogener Ghrelinzufuhr gemessen werden. Dies könnte zumindest zum Teil erklären, warum in unserer Studie die postprandialen Insulinwerte in der Ghrelingruppe keinen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe erreichen konnten und sich lediglich eine Tendenz zu höheren Werten zeigte. Dies müsste man aber mit geringeren Ghreлиндosen noch vertieft untersuchen.

5. Zusammenfassung

Ghrelin ist bisher das einzige periphere Peptidhormon gastralen Ursprungs von dem man ausgeht, dass es orexigene Effekte erzeugt. Sein präprandialer Anstieg soll u.a. die Nahrungsaufnahme initiieren und Hunger auslösen. Diese Vermutungen wurden bisher durch Untersuchungen gestützt, die Ghrelin in hohen Dosen infundierten und den Zusammenhang zwischen den resultierenden Plasmaghrelinwerten und dem auftretenden Hunger maßen.

Ein Ziel unserer Studie war es, eine Ghrelinosis zu finden, deren kontinuierliche Infusion dem physiologischen präprandialen Ghrelinanstieg entspricht. Diese lag bei 1 ng/kgKG/min und ist die niedrigste bisher in der Literatur beschriebene Dosierung.

Den Effekt dieser Ghrelininfusion auf die Menge und den Zeitpunkt der aufgenommenen Nahrung zu untersuchen, war ein weiteres Ziel. Zudem untersuchten wir die daraus resultierenden Insulin-, Glukose-, Wachstumshormon- und Cortisolwerte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, dass die Infusion einer nahezu physiologischen Ghrelinmenge in der Periode zwischen zwei Mahlzeiten, keinen Einfluss auf Hungerentwicklung, Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme oder Kalorienmenge der zweiten Mahlzeit hat. Es ist anzumerken, dass den Probanden nach einem standardisierten Frühstück sowohl Zeitpunkt, als auch Menge des Mittagessens freigestellt wurde, und dass die Studie doppelblind und randomisiert durchgeführt wurde. Es wurden ausschließlich gesunde männliche Probanden untersucht.

Unsere Ergebnisse legen die Erkenntnis nahe, dass der Anstieg der Plasmaghrelinwerte während der späten postprandialen Phase somit unter diesen Umständen wohl eher keine physiologische Rolle in der Initiation der Nahrungsaufnahme spielt.

Außerdem machen unsere Daten, die zeigen, dass durch die Ghrelininfusion signifikant höhere Glukosewerte erreicht werden, einen Effekt auf die Magenentleerung und den Kohlenhydratstoffwechsel wahrscheinlich, der möglicherweise durch das Wachstumshormon hervorgerufen wird, denn auch die Plasma-GH-Spiegel stiegen unter Ghrelininfusion signifikant an.

Zusammenfassend können wir also feststellen, dass wir vorhergehende Studien, die zeigten, dass es durch hochdosierte Ghrelininfusion zu einer Verstärkung des Hungers und der Nahrungsaufnahme kommt, durch die Ergebnisse unserer Versuche mit niedrig dosierter Ghrelininfusion, so nicht bestätigen können.

6. Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Dieses Modell veranschaulicht die Signale, die die Nahrungsaufnahme beeinflussen. Die Adipositassignale Leptin und Insulin, die direkt proportional zum Körperfettanteil ausgeschüttet werden, interagieren mit dem ZNS über den ARC und kontrollieren den langfristigen Stoffwechsel und den Fettgehalt des Körpers. Sättigungssignale aus dem GI-Trakt, die direkt nach Nahrungsaufnahme ausgeschüttet werden, senden dem ZNS Signale über die mechanischen und chemischen Eigenschaften der aufgenommenen Nahrung. Diese werden über sensorische Axone des N.vagus und des Sympathikus zum Nucleus tractus solitarii im Hirnstamm geleitet. Dort werden diese Informationen umgewandelt und induzieren Reaktionen in verschiedenen Regionen des Hypothalamus, der wiederum je nach aufgenommenem Essen eine weitere Nahrungsaufnahme induziert oder reduziert [16, 21].

Tabelle 1: Probandenkollektiv der gesamten Studie (n=23) mit durchschnittlichem Alter, BMI, RR und Puls. Die Daten sind als Durchschnittswerte \pm SEM angegeben.

Abb. 2: Visuelle Analogskalen zur Beurteilung des Hunger- bzw. Sättigungsgefühls. Die Probanden waren angehalten, durch einen vertikalen Strich ihr aktuelles Befinden anzugeben.

Abb. 3: Versuchsaufbau der VS 1: nach einer 20-minütigen Ruhephase wurde das Frühstück bei 0 min gereicht. Die nächsten 120 min wird viertelstündlich Blut entnommen und die VAS von den Probanden ausgefüllt. Von 120 bis 300 min erfolgt dies 30-minütig.

Abb. 4: Versuchsaufbau der VS 2: nach einer 40-minütigen Ruhephase wurde bei 0min die Ghrelininfusion begonnen. In den folgenden 30 min wurde Ghrelin in einer Konzentration von 0.5 ng/kgKG/min infundiert, von 30 bis 60 min mit 1 ng/kgKG/min und schließlich von 60 bis 90 min mit 2 ng/kgKG/min. Während dieser Zeit erfolgten die Blutentnahmen und das Ausfüllen der VAS 10-minütig.

Abb. 5: Versuchsaufbau der VS 4: nach einer 40-minütigen Ruhephase wurde das Frühstück bei 0 min gereicht. In den folgenden 60 min fanden die Blutentnahmen bzw. VAS-Evaluationen 10-minütlich statt. Von 60 bis 300 min wurde 1 ng/kgKG/min Ghrelin bzw. NaCl infundiert. In diesem Zeitraum konnten die Probanden, wenn sie wieder Hunger

verspürten, eine zweite Mahlzeit zu sich nehmen, dessen Menge und Zeitpunkt selbst bestimmt wurde.

Abb. 6: Verlauf der physiologischen Acyl-Ghrelinwerte in VS 1 (n=8).

Abb. 7: Verlauf der physiologischen Hunger- und Sättigungswerte in VS 1 (n=8).

Abb. 8: Verlauf der Acyl-Ghrelinwerte in VS 2 während Infusion ansteigender Ghrelin Dosen (n=4). Bei 1 ng/kgKG/min zeigt sich ein Verlauf, der dem physiologischen postprandialen Anstieg am Nächsten kommt.

Abb. 9: Verlauf der Acyl-Ghrelinwerte in VS 3 während Infusion von 1 ng/kgKG/min (n=4).

Tabelle 2: Basalwerte von Glucose, Insulin, Acyl-Ghrelin, Cortisol und Wachstumshormon der VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Die Daten sind als Durchschnittswerte \pm SEM angegeben.

Abb. 10: Verlauf der Acyl-Ghrelinwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet.

Abb. 11: Verlauf der Hungerratings in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet.

Abb. 12: Verlauf Sättigungsratings in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet. Man beachte den signifikant stärkeren Anstieg des Sättigungsgefühls in der Ghrelingruppe nach Einnahme der zweiten Mahlzeit. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen eine Signifikanz von $p < 0.05$ zwischen Werten unter Placebo- bzw. Ghrelininfusion.

Tabelle 3: Zeitpunkt und Menge der aufgenommenen Nahrung sowie des verzehrten Wassers im Verum/Placebovergleich der VS 4 (n=20). Die Daten sind als Durchschnittswerte \pm SEM angegeben.

Abb. 13: Der Verlauf der Blutzuckerwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet. Man beachte, dass es aber nach Einnahme der zweiten Mahlzeit bei der Ghrelininfusion zu signifikant erhöhten Glukosewerten von 255 – 300 min im Placebovergleich kam. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen eine Signifikanz von $p < 0.05$ zwischen Werten unter Placebo- bzw. Ghrelininfusion.

Abb. 14: Der Verlauf der Insulinwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Zudem ist der jeweilige Zeitpunkt der zweiten Mahlzeit gekennzeichnet.

Abb. 15: Der Verlauf der Cortisolwerte in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20).

Abb. 16: Der Verlauf der GH-Spiegel in VS 4 im Placebo- und Verumvergleich (n=20). Während Ghrelininfusion zeigen sich signifikant erhöhte Wachstumshormonwerte. Die mit * gekennzeichneten Werte zeigen eine Signifikanz von $p < 0.05$ zwischen Werten unter Placebo- bzw. Ghrelininfusion.

Abb. 17: Das Peptidhormon Ghrelin. Man beachte die N-Octanoyl-Gruppe an Serin 3 [64]

7. Abkürzungsverzeichnis

α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone
Abb.	Abbildung
AGRP	agouti-related protein
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AUC	Area under the Curve
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CART	cocaine and amphetamine related transcript
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Komplexbildner
et al.	lat. „und andere“
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
i.v.	intravenös
GOAT	Ghrelin O-acyl-transverase
GH	growth hormone, Wachstumshormon
GH-RH	growth hormone releasing hormone
GHS-R	growth hormone secretagogue-receptor
GHSs	growth hormone secretagogues
h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
m ²	Quadratmeter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
NaF	Natriumfluorid
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
POMC	pro-opio-melanocortin
RIA	Radioimmunassay
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> ; „Umdrehungen pro Minute“
RR	sogenannt(e/s)
SEM	Standard error oft the mean
u.a.	unter Anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
uvm.	und viele(s) mehr
v.a.	vor allem
VAS	Visuelle Analogskala
VS	Versuchsserie
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µU	Mikrounits

8. Quellenangaben:

1. Bundesamt, S., *Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit - Körpermaße der Bevölkerung 2009, 2011*, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden.
2. Flegal, K.M., et al., *Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008*. JAMA, 2010. **303**(3): p. 235-41.
3. Herold, G., *Innere Medizin 2009 : eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Herold innere Medizin 2009, Köln: Selbstverl. 911 S.
4. Must, A., et al., *The disease burden associated with overweight and obesity*. JAMA, 1999. **282**(16): p. 1523-9.
5. Konnopka, A., M. Bodemann, and H.H. König, *Health burden and costs of obesity and overweight in Germany*. Eur J Health Econ, 2011. **12**(4): p. 345-52.
6. Gull, W.W., *Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica)*. 1868. Obes Res, 1997. **5**(5): p. 498-502.
7. Bosaeus, I., et al., *Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients*. Int J Cancer, 2001. **93**(3): p. 380-3.
8. Langhans, W., *Peripheral mechanisms involved with catabolism*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(4): p. 419-26.
9. Coss, C.C., C.E. Bohl, and J.T. Dalton, *Cancer cachexia therapy: a key weapon in the fight against cancer*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(3): p. 268-73.
10. Hagan, S. and K.D. Niswender, *Neuroendocrine regulation of food intake*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **58**(1): p. 149-53.
11. Kennedy, G.C., *The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1953. **140**(901): p. 578-96.
12. Ahren, B., et al., *Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 2): p. R113-20.
13. Havel, P.J., *Mechanisms regulating leptin production: implications for control of energy balance*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(3): p. 305-6.

14. Bagdade, J.D., E.L. Bierman, and D. Porte, Jr., *The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects*. J Clin Invest, 1967. **46**(10): p. 1549-57.
15. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N.Engl.J.Med., 1996. **334**(5): p. 292-295.
16. Woods, S.C., *Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake*. Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol, 2004. **286**(1): p. G7-13.
17. Polonsky, K.S., B.D. Given, and E. Van Cauter, *Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects*. J Clin Invest, 1988. **81**(2): p. 442-8.
18. Ahima, R.S., et al., *Leptin regulation of neuroendocrine systems*. Frontiers in Neuroendocrinology, 2000. **21**: p. 263-307.
19. Niswender, K.D. and M.W. Schwartz, *Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities*. Front Neuroendocrinol, 2003. **24**(1): p. 1-10.
20. Elmquist, J.K., C.F. Elias, and C.B. Saper, *From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight*. Neuron, 1999. **22**(2): p. 221-32.
21. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-671.
22. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**: p. 656-660.
23. Date, Y., et al., *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans*. Endocrinology, 2000. **141**: p. 4255-4261.
24. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-913.
25. Tschop, M., et al., *Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels*. J.Endocrinol.Invest., 2001. **24**(6): p. RC19-RC21.
26. Cummings, D.E., et al., *A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1714-9.
27. Shiiya, T., et al., *Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion*. J.Clin.Endocrinol.Metabol., 2002. **87**(1): p. 240-244.

-
28. Erdmann, J., F. Lippl, and V. Schusdziarra, *Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man*. Regul.Pept., 2003. **116**(1-3): p. 101-107.
 29. Tannous dit El Khoury, D., et al., *Variations in postprandial ghrelin status following ingestion of high-carbohydrate, high-fat, and high-protein meals in males*. Ann Nutr Metab, 2006. **50**(3): p. 260-9.
 30. Al Awar, R., et al., *Postprandial acylated ghrelin status following fat and protein manipulation of meals in healthy young women*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(4): p. 405-11.
 31. Bednarek, M.A., et al., *Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a*. J.Med.Chem., 2000. **43**(23): p. 4370-4376.
 32. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. Physiol Rev., 2005. **85**(2): p. 495-522.
 33. Kirchner, H., et al., *GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance*. Nat.Med., 2009.
 34. Akamizu, T., et al., *Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite*. Eur.J.Endocrinol., 2008. **158**(4): p. 491-498.
 35. Adachi, S., et al., *Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: A prospective randomized placebo-controlled phase II study*. Gastroenterology, 2010.
 36. Schmid, D.A., et al., *Ghrelin stimulates appetite, imagination of food, GH, ACTH, and cortisol, but does not affect leptin in normal controls*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(6): p. 1187-92.
 37. Hotta, M., et al., *Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study*. Endocr J, 2009. **56**(9): p. 1119-28.
 38. Levin, F., et al., *Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2006. **91**(9): p. 3296-3302.
 39. Falken, Y., et al., *Actions of prolonged ghrelin infusion on gastrointestinal transit and glucose homeostasis in humans*. Neurogastroenterol Motil, 2010.
 40. Druce, M.R., et al., *Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects*. Int.J.Obes.(Lond), 2005. **29**(9): p. 1130-1136.
 41. Neary, N.M., et al., *Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2004. **89**(6): p. 2832-2836.

-
42. Ang, D., et al., *Influence of ghrelin on the gastric accommodation reflex and on meal-induced satiety in man*. Neurogastroenterol.Motil., 2009.
 43. Ashby, D.R., et al., *Sustained appetite improvement in malnourished dialysis patients by daily ghrelin treatment*. Kidney Int., 2009.
 44. Benso, A., et al., *Beta-adrenergic agonism does not impair the GH response to acylated ghrelin in humans*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(2): p. 234-6.
 45. Huda, M.S., et al., *Ghrelin restores 'lean-type' hunger and energy expenditure profiles in morbidly obese subjects but has no effect on postgastrectomy subjects*. Int.J.Obes.(Lond), 2009. **33**(3): p. 317-325.
 46. Vestergaard, E.T., et al., *Constant intravenous ghrelin infusion in healthy young men: clinical pharmacokinetics and metabolic effects*. Am.J.Physiol Endocrinol.Metab, 2007. **292**(6): p. E1829-E1836.
 47. Wren, A.M., et al., *Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans*. J.Clin.Endocrinol.Metab., 2001. **86**(12): p. 5992-5995.
 48. Murray, C.D., et al., *Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: a double blind, placebo controlled, crossover study*. Gut, 2005. **54**(12): p. 1693-8.
 49. Huda, M.S., et al., *Lack of an acute effect of ghrelin on markers of bone turnover in healthy controls and post-gastrectomy subjects*. Bone, 2007. **41**(3): p. 406-13.
 50. Kiewiet, R.M., et al., *Effects of acute administration of acylated and unacylated ghrelin on glucose and insulin concentrations in morbidly obese subjects without overt diabetes*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(4): p. 567-73.
 51. Paulo, R.C., et al., *Estrogen elevates the peak overnight production rate of acylated ghrelin*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2008. **93**(11): p. 4440-4447.
 52. Veldhuis, J.D., et al., *Twenty-four hour continuous ghrelin infusion augments physiologically pulsatile, nycthemeral, and entropic (feedback-regulated) modes of growth hormone secretion*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2008. **93**(9): p. 3597-3603.
 53. Miljic, D., et al., *Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1491-5.
 54. Cummings, D.E., et al., *Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues*. Am.J.Physiol Endocrinol.Metab, 2004. **287**(2): p. E297-E304.

-
55. Erdmann, J., et al., *Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose.* J.Clin.Endocrinol.Metab, 2004. **89**(6): p. 3048-3054.
 56. Erdmann, J., et al., *Food intake and plasma ghrelin response during potato-, rice- and pasta-rich test meals.* Eur.J.Nutr., 2007. **46**(4): p. 196-203.
 57. Grossman, M.I., *Physiological effects of gastrointestinal hormones.* Fed Proc, 1977. **36**(7): p. 1930-2.
 58. Flint, A., et al., *Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(1): p. 38-48.
 59. Gauna, C., et al., *Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(10): p. 5035-42.
 60. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.* J Clin Invest, 1960. **39**: p. 1157-75.
 61. Hosoda, H., et al., *Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing.* J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 64-70.
 62. Jeon, T.Y., et al., *Changes in plasma ghrelin concentration immediately after gastrectomy in patients with early gastric cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5392-6.
 63. Kojima, M., H. Hosoda, and K. Kangawa, *Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor.* Horm Res, 2001. **56 Suppl 1**: p. 93-7.
 64. St-Pierre, D.H., L. Wang, and Y. Tache, *Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance.* News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 242-6.
 65. Gutierrez, J.A., et al., *Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2008. **105**(17): p. 6320-6325.
 66. Lucidi, P., et al., *Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans.* J Endocrinol Invest, 2004. **27**(5): p. RC12-5.
 67. Banks, W.A., et al., *Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 822-7.

-
68. Howard, A.D., et al., *A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release*. Science, 1996. **273**(5277): p. 974-7.
69. Guan, X.M., et al., *Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues*. Brain Res.Mol.Brain Res., 1997. **48**(1): p. 23-29.
70. Smith, R.G., et al., *A nonpeptidyl growth hormone secretagogue*. Science, 1993. **260**(5114): p. 1640-3.
71. Kojima, M., et al., *Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. Trends Endocrinol.Metab, 2001. **12**(3): p. 118-122.
72. van der Lely, A.J., et al., *Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin*. Endocr.Rev., 2004. **25**(3): p. 426-457.
73. Chen, C., D. Wu, and I.J. Clarke, *Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs*. J Endocrinol, 1996. **148**(3): p. 381-6.
74. Druce, M. and S.R. Bloom, *Central regulators of food intake*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003. **6**(4): p. 361-7.
75. Friedman, J.M., *The function of leptin in nutrition, weight, and physiology*. Nutr Rev, 2002. **60**(10 Pt 2): p. S1-14; discussion S68-84, 85-7.
76. Huda, M.S., J.P. Wilding, and J.H. Pinkney, *Gut peptides and the regulation of appetite*. Obes Rev, 2006. **7**(2): p. 163-82.
77. Cowley, M.A., et al., *The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis*. Neuron, 2003. **37**(4): p. 649-61.
78. Riediger, T., et al., *Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus*. Neurosci Lett, 2003. **341**(2): p. 151-5.
79. Scott, V., D.M. McDade, and S.M. Luckman, *Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status*. Physiol Behav, 2007. **90**(1): p. 180-5.
80. Sakurai, T., et al., *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior*. Cell, 1998. **92**(4): p. 573-85.
81. Toshinai, K., et al., *Ghrelin-Induced Food Intake Is Mediated via the Orexin Pathway*. Endocrinology, 2003. **144**(4): p. 1506-1512.

-
82. Sakata, I., et al., *Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion*. *Neurosci Lett*, 2003. **342**(3): p. 183-6.
 83. Cummings, D.E., et al., *Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery*. *N.Engl.J.Med.*, 2002. **346**(21): p. 1623-1630.
 84. Hansen, T.K., et al., *Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity*. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, 2002. **56**(2): p. 203-206.
 85. Haqq, A.M., et al., *Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in prader-willi syndrome*. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 2003. **88**(1): p. 174-178.
 86. Rosicka, M., et al., *Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels*. *Physiol Res.*, 2003. **52**(1): p. 61-66.
 87. Tschop, M., et al., *Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): p. 707-709.
 88. Otto, B., et al., *Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa*. *Eur.J.Endocrinol.*, 2001. **145**(5): p. 669-673.
 89. Soriano-Guillen, L., et al., *Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation*. *J Pediatr*, 2004. **144**(1): p. 36-42.
 90. Purnell, J.Q., D. Cummings, and D.S. Weigle, *Changes in 24-h area-under-the-curve ghrelin values following diet-induced weight loss are associated with loss of fat-free mass, but not with changes in fat mass, insulin levels or insulin sensitivity*. *Int J Obes (Lond)*, 2007. **31**(2): p. 385-9.
 91. Kraemer, R.R. and V.D. Castracane, *Exercise and humoral mediators of peripheral energy balance: ghrelin and adiponectin*. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, 2007. **232**(2): p. 184-194.
 92. Nagaya, N., et al., *Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors*. *Circulation*, 2001. **104**(17): p. 2034-2038.
 93. Shimizu, Y., et al., *Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(2): p. 774-8.
 94. Wolf, I., et al., *Adiponectin, ghrelin, and leptin in cancer cachexia in breast and colon cancer patients*. *Cancer*, 2006. **106**(4): p. 966-73.

95. DelParigi, A., et al., *High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2002. **87**(12): p. 5461-5464.
96. Goldstone, A.P., et al., *Elevated fasting plasma ghrelin in prader-willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(4): p. 1718-26.
97. Cummings, D.E., et al., *Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome*. Nat.Med., 2002. **8**(7): p. 643-644.
98. Wren, A.M., et al., *Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2540-2547.
99. Sun, Y., S. Ahmed, and R.G. Smith, *Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite*. Mol.Cell Biol., 2003. **23**(22): p. 7973-7981.
100. Sun, Y., et al., *Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4679-84.
101. Wortley, K.E., et al., *Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2004. **101**(21): p. 8227-8232.
102. Zigman, J.M., et al., *Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3564-72.
103. Sturm, K., et al., *Appetite, food intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2003. **88**(8): p. 3747-3755.
104. English, P.J., et al., *Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans*. J.Clin.Endocrinol.Metab, 2002. **87**(6): p. 2984.
105. Akamizu, T., et al., *Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects*. Eur.J.Endocrinol., 2004. **150**(4): p. 447-455.
106. Strasser, F., et al., *Safety, tolerability and pharmacokinetics of intravenous ghrelin for cancer-related anorexia/cachexia: a randomised, placebo-controlled, double-blind, double-crossover study*. Br J Cancer, 2008. **98**(2): p. 300-8.
107. Masuda, Y., et al., *Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 2000. **276**: p. 905-908.

-
108. Dornonville de la Cour, C., et al., *Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells*. Regul Pept, 2004. **120**(1-3): p. 23-32.
109. Sallam, H.S., et al., *Ghrelin improves burn-induced delayed gastrointestinal transit in rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(1): p. R253-7.
110. Chen, Y.T., et al., *Ghrelin improves LPS-induced gastrointestinal motility disturbances: roles of NO and prostaglandin E2*. Shock, 2010. **33**(2): p. 205-12.
111. Sallam, H.S. and J.D. Chen, *The prokinetic face of ghrelin*. Int J Pept, 2010. **2010**.
112. Malagelada, J.R., et al., *Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man*. Gastroenterology, 1976. **70**(2): p. 203-210.
113. Muller-Lissner, S., *[Normal stomach emptying and its disorders]*. Leber Magen Darm, 1986. **16**(1): p. 11-9.
114. Nagaya, N., et al., *Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers*. Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1483-R1487.
115. Vestergaard, E.T., et al., *Cardiovascular effects of intravenous ghrelin infusion in healthy young men*. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, 2007. **293**(5): p. H3020-H3026.
116. Broglio, F., et al., *Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans*. J.Clin.Endocrinol.Metab., 2001. **86**(10): p. 5083-5086.
117. Deetjen, P., C. Alzheimer, and H. Deetjen Speckmann, *Physiologie*. 4., vollst. bearb. Aufl. ed2005, München [u.a.]: Elsevier. XVI, 944 S.
118. Ukkola, O., *Ghrelin and insulin metabolism*. Eur.J.Clin.Invest, 2003. **33**(3): p. 183-185.
119. Adeghate, E. and A.S. Ponery, *Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats*. J.Neuroendocrinol., 2002. **14**(7): p. 555-560.
120. Date, Y., et al., *Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 124-129.
121. Lee, H.M., et al., *Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations*. Endocrinology, 2002. **143**(1): p. 185-190.
122. Reimer, M.K., G. Pacini, and B. Ahren, *Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse*. Endocrinology, 2003. **144**(3): p. 916-21.

123. Kamegai, J., et al., *Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats.* Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2438-2443.

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Reincke für die freundliche Aufnahme in die Medizinische Klinik und die Möglichkeit zur Nutzung der technischen Einrichtungen danken.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Schusdziarra für die gute Zusammenarbeit und die Förderung.

Besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Otto bedanken für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie für ihre hilfsbereite motivierende Unterstützung.

Große Rückhalt durfte ich von Frau Dipl. Ing. Lichter erfahren. Ich danke ihr ganz herzlich sowohl für die Durchführung der Radioimmunoassays, sowie für ihre fortwährende Unterstützung bei der Realisierung der Studie. An dieser Stelle möchte ich auch Frau Tholl und Frau Czogalla-Peter für die Hilfe bei den Laboranalysen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meinem Betreuer Herrn Dr. Lippl für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten, die Beratung bei der Planung und Durchführung der Versuche und die Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der Daten. Ich danke ihm zudem für die fortwährende Motivation und die Ermutigung beim Schreiben dieser Arbeit.

Zudem motivierte er mich, die Ergebnisse meiner Arbeit am Deutschen Kongress der DGVS in Stuttgart im Rahmen einer Posterpräsentation vorzustellen und ermöglichte die Veröffentlichung der Daten in der internationalen Fachzeitschrift *Regulatory peptides* (IF 2,1) (F. Lippl, J. Erdmann, **A. Steiger**, N. Lichter, C. Czogalla-Peter, M. Bidlingmaier, S. Tholl, V. Schusdziarra, *Low-dose ghrelin infusion — Evidence against a hormonal role in food intake*, *Regulatory Peptides*, Volume 174, Issues 1–3, 10 February 2012, 26-31).

Zuletzt möchte ich noch allen Menschen danken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit mit Sachverstand und persönlicher Ermutigung beiseite standen, besonders meinen Eltern.

Eidesstattliche Versicherung

Steiger, Amelie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der Plasma-Ghrelinspiegel für die Hunger- und Sättigungsregulation

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin